

**Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen
zu Prenyltransferasen aus
Stigmatella aurantiaca und *Aspergillus fumigatus***

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Edyta Stec
aus Krakau

Marburg/Lahn 2012

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am 05. März 2012.

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li

Zweitgutachter: Prof. Dr. Maike Petersen

Tag der mündlichen Prüfung am: 19. April 2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Publikationen.....	5
Beiträge zu Kongressen	5
Abkürzungen.....	6
Zusammenfassung.....	8
Summary	10
1 Einleitung.....	12
1.1 Prenyltransferasen	12
1.1.1 Isoprenyl-Diphosphat-Synthasen und Protein-Prenyltransferasen	12
1.1.2 Aromatische Prenyltransferasen	13
1.2 Prenylierte aromatische Substanzen	18
1.2.1 Primärmetabolite	18
1.2.2 Sekundärmetabolite.....	19
1.2.3 Chemoenzymatische Synthese von prenylierten Indolalkaloiden	24
1.3 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Chemikalien, Säulenmaterial und Enzyme	28
2.1.1 Chemikalien.....	28
2.1.2 Säulenmaterial.....	30
2.1.3 Enzyme und Kits.....	30
2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Primer.....	31
2.2.1 Bakterienstämme.....	31
2.2.2 Plasmide.....	31
2.2.3 Primer.....	35
2.3 Nährmedien, Antibiotika und Lösungen.....	36
2.3.1 Nährmedien	36
2.3.2 Antibiotika	38
2.3.3 Puffer und Lösungen	38
2.4 Chemische Synthesen	42
2.4.1 Synthese von GPP	42
2.4.2 Synthese von FPP	43

2.5	Kultivierungsbedingungen	43
2.6	Methoden der Molekularbiologie.....	43
2.6.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	43
2.6.2	Reinigung und Konzentrierung von DNA	44
2.6.3	Bestimmung von DNA-Konzentration.....	45
2.6.4	Agarosegelelektrophorese	45
2.6.5	DNA-Manipulation.....	45
2.6.6	DNA-Transformation.....	46
2.6.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	47
2.6.8	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen	49
2.6.9	Heterologe Genexpression	50
2.7	Methoden der Biochemie.....	51
2.7.1	Gewinnung von Enzymextrakten aus <i>E. coli</i> M15 [pREP] nach Expression von <i>auaA</i>	51
2.7.2	Gewinnung von löslichen rekombinanten Proteinen aus <i>E. coli</i>	52
2.7.3	Reinigung von His-tag-fusionierten Proteinen mittels Affinitäts- chromatographie.....	52
2.7.4	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.7.5	Western Blot	53
2.7.6	Bestimmung von Molekulargewicht und Konzentration von Proteinen	54
2.7.7	Enzym-Assays.....	55
2.8	Analytische Methoden	57
2.8.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	57
2.8.2	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung.....	60
2.8.3	Massenspektrometrie	60
2.8.4	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	60
3	Ergebnisse.....	62
3.1	Synthese von FPP und GPP	62
3.1.1	GPP-Synthese.....	62
3.1.2	FPP-Synthese	63
3.2	Klonierung und Charakterisierung der Farnesyltransferase AuaA aus <i>Stigmatella aurantiaca</i>	64
3.2.1	Einleitung.....	64
3.2.2	Sequenzanalyse von <i>auaA</i>	64
3.2.3	Klonierung von <i>auaA</i>	67

3.2.4	Überproduktion und Reinigung von AuaA	67
3.2.5	Nachweis der Aktivität von AuaA	68
3.2.6	Subzelluläre Lokalisation von AuaA	69
3.2.7	Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von AuaA	70
3.2.8	Identifizierung der enzymatischen Produkte von AuaA	75
3.2.9	Zielgerichtete Mutagenese von AuaA	78
3.3	Zielgerichtete Mutagenese von 7-DMATS, FgaPT2 und FtmPT1 zur Identifizierung der am Prenyltransfer beteiligten Aminosäuren	84
3.3.1	Einleitung	84
3.3.2	Sequenzanalyse und Einführung der Mutationen	84
3.3.3	Überproduktion und Aufreinigung der mutierten Proteine mit anschließender Bestimmung ihrer Aktivität	87
3.4	Zielgerichtete Mutagenese zur Unterstützung der Strukturaufklärung von FgaPT2	90
3.4.1	Einleitung	90
3.4.2	Herstellung mutierter Derivate von FgaPT2	91
3.4.3	Proteinüberproduktion und Aufreinigung	91
3.4.4	Bestimmung der Aktivität der mutierten FgaPT2-Derivate	92
3.5	Produktion diprenylierter Indolderivate mit Hilfe von zwei rekombinanten Dimethylallyltryptophansynthasen FgaPT2 und 7-DMATS	94
3.5.1	Einleitung	94
3.5.2	Vorversuche zur Herstellung diprenylierter Indolderivate und Analyse der enzymatischen Produkte	95
3.5.3	Bestimmung der Substratspezifität und der Reihenfolge der Reaktionen	97
3.6	Mutagenese zur Änderung der Regiospezifität von FgaPT2 und 7-DMATS	100
3.6.1	Einleitung	100
3.6.2	Sequenzanalyse und Einführung von Mutationen	100
3.6.3	Überproduktion der Proteine und ihre Aufreinigung	103
3.6.4	Untersuchung der Regiospezifität der mutierten Derivate von FgaPT2 und 7-DMATS	104
3.6.5	Identifizierung der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R als 6- und 7-DMAT	107
4	Diskussion	109

4.1	Die Farnesyltransferase AuaA aus <i>S. aurantiaca</i> Sg a15	109
4.2	Zielgerichtete Mutagenese zur Untersuchung katalytisch wichtiger Aminosäurereste in FgaPT2, 7-DMATS und FtmPT1	111
4.3	Zielgerichtete Mutagenese zur Unterstützung der Kristallstruktur von FgaPT2	113
4.4	Herstellung diprenylierter Indolderivate durch Einsatz rekombinanter Prenyltransferasen	114
4.5	Mutagenese als Mittel zur Änderung der Regiospezifität von Enzymen	114
4.6	Aromatische Prenyltransferasen	116
5	Referenzen	118
6	Anhang	129
6.1	NMR-Spektren aus der GPP-Synthese	129
6.2	NMR-Spektren aus der FPP-Synthese	131
6.3	LC-MS-Analyse des enzymatischen Produktes von AuaA nach Inkubation mit 2-Methyl-4-Hydroxychinolin und FPP und Vergleich mit Aurachin D als Standard	134
6.4	Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA	135
6.5	Spektren der enzymatischen Produkte von AuaA	138
6.5.1	2-Methyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin (Aurachin D)	138
6.5.2	3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	139
6.5.3	2-Amino-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	140
6.5.4	3-Farnesyl-4-Hydroxy-7-Chloroquinolin	141
6.5.5	2,6-Dimethyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	142
6.5.6	2,4-Dihydroxy-3-Farnesylchinolin	143
6.6	Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA_R53A	144
6.7	MS-Daten der enzymatischen Produkte nach Tandeminkubation mit FgaPT2 und 7-DMATS	145
6.8	Spektren der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R	149
	Danksagung	151
	Curriculum vitae	153

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Stec E, Pistorius D, Müller R, Li S-M (2011)

AuaA, a membrane-bound farnesyltransferase from *Stigmatella aurantiaca*, catalyzes the prenylation of 2-methyl-4-hydroxyquinoline in the biosynthesis of aurachins.

Chembiochem 12:1724-1730

Stec, E. & Li, S.-M. (2012)

Mutagenesis and biochemical studies on AuaA confirmed the importance of the two conserved aspartate-rich motifs and suggested difference in the amino acids for substrate binding in membrane-bound prenyltransferases.

Arch Microbiol, DOI: 10.1007/s00203-012-0795-0

Stec E, Steffan N, Kremer A, Zou H, Zheng X, Li S-M (2008)

Two lysine residues are responsible for the enzymatic activities of indole prenyltransferases from fungi.

Chembiochem 9:2055-2058

Metzger U, Schall C, Zocher G, Unsöld I, Stec E, Li S-M, Heide L, Stehle T (2009)

The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria.

Proc Natl Acad Sci USA 106:14309-14314

Ruan H-L, Stec E, Li S-M (2009)

Production of diprenylated indole derivatives by tandem incubation of two recombinant dimethylallyltryptophan synthases.

Arch Microbiol 191:791-795

Beiträge zu Kongressen

Stec E, Steffan N, Kremer A, Zou H, Zheng X, Li S-M

Two lysine residues are responsible for the enzymatic activities of indole prenyltransferases from fungi.

VAAM 9th Molecular Biology of Fungi Symposium in Münster, September 2009

Abkürzungen

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Acc. No.	Kennnummer (accession number)
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar
BRCP	breast cancer resistance protein
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
d	Duplett
Da	Dalton
dem.	demineralisiert
DMA	Dimethylallyl
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMASPP	Dimethylallyl-S-Thiolopyrophosphat
DMAT	Dimethylallyltryptophan
DMATS	Dimethylallyltryptophansynthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPP	Farnesyldiphosphat
FTase	Farnesyltransferase
<i>g</i>	Beschleunigung
gDNA	genomische DNA
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GPP	Geranyldiphosphat
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation
Hz	Hertz
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPPS	Isoprenyl-Diphosphat-Synthase
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactosid
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance)
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (open reading frame)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDB	Proteindatenbank
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RP	Umkehrphase (reversed-phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)

s	Singulett
<i>S. aurantiaca</i>	<i>Stigmatella aurantiaca</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. spheroides</i>	<i>Streptomyces spheroides</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
t	Triplett
TAE	Tris-EDTA-Acetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (trifluoro acetic acid)
UPPS	Undecaprenyl-Diphosphat-Synthase
v	Volumen
w	Masse (weight)
W	Watt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid

Zusammenfassung

Prenylierte Naturstoffe sind in allen lebenden Organismen weit verbreitet und weisen häufig biologische Aktivitäten auf, die sich oft von ihren nicht prenylierten Vorstufen unterscheiden. Transferreaktionen von Isopreneinheiten von einem Prenyldonor auf ein Akzeptormolekül, wie z.B. ein Terpenoid, ein Serinrest oder einen Aromaten, werden von Prenyltransferasen katalysiert. Für die letzte Reaktion sind die sogenannten aromatischen Prenyltransferasen verantwortlich, die als membrangebundene oder lösliche Enzyme in Pflanzen, Pilzen und Bakterien auftreten und zu einer großen Vielfalt an Primär- und Sekundärmetaboliten beitragen.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte sind viele prenylierte Substanzen mit interessanten biologischen Aktivitäten aus Mikroorganismen isoliert worden, deren Biosynthese großteils noch unbekannt war. Zu diesen Naturstoffen gehörten unter anderem die Aurachine, eine Gruppe von Chinolinalkaloiden aus Myxobakterien. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte das Gen *auaA* aus dem putativen Gencluster für Aurachinbiosynthese in dem Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 heterolog in *E. coli* exprimiert und das Genprodukt anschließend biochemisch charakterisiert werden. Dabei wurde eindeutig gezeigt, dass AuaA als eine Farnesyltransferase fungiert und die Bildung von Aurachin D durch Prenylierung von 2-Methyl-4-Hydroxychinolin an Position C3 des Chinolinrings katalysiert. Die enzymatische Reaktion folgte der Michaelis-Menten-Kinetik und war strikt abhängig von divalenten Metallionen. Die K_M -Werte für 2-Methyl-4-Hydroxychinolin und FPP betrugen 0.27 mM und 0.043 mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit 2.21 nmol/min*mg. AuaA zeigte Flexibilität gegenüber aromatischen Substraten, da es neben dem natürlichen Substrat auch sechs weitere 4-Hydroxychinoline akzeptierte und sogar zwei von sechs getesteten Flavonoiden in geringem Maße umsetzte. Im Gegensatz dazu war das Enzym relativ spezifisch in Bezug auf den Prenyldonor. Neben FPP akzeptierte AuaA zwar GPP, jedoch nur mit einer relativen Aktivität von 3.3 %.

Mittels zielgerichteter Mutagenese wurden ausgewählte Aminosäurereste in den für membrangebundene aromatische Prenyltransferasen charakteristischen aspartatreichen Motiven in AuaA untersucht. Durch die Mutationen konnte die essentielle Bedeutung der konservierten Asparaginsäurereste bestätigt werden. Die Mutation des Arginins im ersten aspartatreichen Motiv (NRxxDxxxD) zeigte, dass die Aminosäure an zweiter Position in dem Motiv nicht direkt in die von AuaA katalysierte Reaktion involviert ist, was einen Unterschied zu LePGT1, einer weiteren Prenyltransferase dieser Enzymgruppe, darstellt.

Die Enzyme FgaPT2, FtmPT1 und 7-DMATS aus *Aspergillus fumigatus* gehören zu aromatischen Prenyltransferasen der DMATS-Familie und katalysieren den Transfer eines Prenylrests auf einen Indolkörper. Anders als membrangebundene aromatische Prenyltransferasen enthalten sie keine konservierten aspartatreichen Motive zur Bindung des Prenyldiphosphates durch divalente Metallionen und ihre Aktivität ist ionenunabhängig. Diese Tatsache führte zu der Vermutung, dass in den Prenyltransferasen der DMATS-

Familie basische Aminosäuren die Rolle der Metallionen bei der Koordination von Prenyldiphosphat übernehmen könnten. Mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese wurde die Bedeutung von drei konservierten basischen Aminosäureresten für die katalytische Aktivität der Prenyltransferasen FgaPT2, FtmPT1 und 7-DMATS untersucht. Die Experimente zeigten, dass zwei Lysinreste in die von allen drei Enzymen katalysierten Prenylierungsreaktionen involviert sind, während die Mutation des ausgewählten Argininrests nur in FgaPT2 zu einem deutlichen Aktivitätsverlust führte. Dies deutete darauf hin, dass dieser Argininrest in FtmPT1 und 7-DMATS nicht direkt an der Prenylierung beteiligt ist.

Durch Aufklärung der Struktur von FgaPT2 und Analysen des Enzymkomplexes mit L-Tryptophan und DMASPP, dem Substratanalogon von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), konnte ein Prenylierungsmechanismus postuliert werden, bei dem die Aminosäurereste E89, R100 und K174 eine essentielle Rolle spielen sollten. Zur Überprüfung der Hypothese wurden diese Aminosäurereste mutiert und anschließend die Auswirkung der Mutationen auf die Aktivität von FgaPT2 untersucht. Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Austausch von E89 und R100 bestätigte die essentielle Rolle dieser Reste für die Katalyse von FgaPT2. Dagegen konnte die Substitution von K174 durch Glutamin die Notwendigkeit dieser Aminosäure für den Reaktionsmechanismus nicht unterstützen.

Das Potential aromatischer Prenyltransferasen als Werkzeuge für die chemoenzymatische Synthese von einfach prenylierten Tryptophanderivaten, Naphthalinen, Flavonoiden oder Tyrosinen wurde mehrfach nachgewiesen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig die Produktion von diprenylierten Indolderivaten mit Hilfe der zwei löslichen pilzlichen Prenyltransferasen FgaPT2 und 7-DMATS demonstriert werden. Nach Tandeminkubationen von zehn einfachen Tryptophanderivaten mit FgaPT2 und anschließend mit 7-DMATS konnten mittels HPLC zusätzlich zu den Peaks für monoprenylierte Derivate weitere Peaks in den Reaktionsgemischen detektiert werden. Dabei wurde die beste Umsetzung für L-Abrin (92.7 %) und L-Tryptophan (89.7 %) beobachtet. Drei der zusätzlichen enzymatischen Produkte wurden isoliert und mittels LC-MS und NMR als C4,C7-diprenylierte Indolderivate identifiziert.

In einem weiteren Projekt wurde die Regiospezifität von FgaPT2 und 7-DMATS mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese beeinflusst. Basierend auf den Informationen über die Beschaffenheit des aktiven Zentrums von FgaPT2 wurden Derivate von FgaPT2 und 7-DMATS generiert und mit L-Tryptophan in Anwesenheit von DMAPP inkubiert. HPLC-Analyse der Reaktionsgemische zeigte die Bildung von jeweils zwei enzymatischen Produkten in den Assays mit den Doppelmутanten FgaPT2_I80F_R244E und 7-DMATS_F129I_E298R. Die enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R wurden über HPLC isoliert und mittels NMR- und MS-Analyse als 6- und 7-DMAT identifiziert. Durch den Austausch von zwei Aminosäureresten konnte die Regiospezifität von 7-DMATS so modifiziert werden, dass die Übertragung des Prenylrests nicht nur an Position C7 sondern auch an Position C6 des Indolringes stattgefunden hat.

Summary

Prenylated compounds are widely distributed in all living organisms and often possess biological activities differing from their non-prenylated precursors. Transfer reactions of an isoprene moiety from a prenyl donor onto an acceptor molecule, e. g. a terpenoid, a serine residue of a protein or an aromatic molecule, are catalyzed by prenyltransferases. Aromatic prenyltransferases are responsible for prenylation of aromatic compounds and found as membrane-bound or soluble enzymes in bacteria, fungi and plants. They contribute to the diversity of primary and secondary metabolites. During the last decades, many prenylated natural products were isolated from different microorganisms. These natural products include aurachins, a group of quinoline alkaloids from myxobacteria. In this thesis the gene *auaA* from the putative biosynthetic gene cluster of aurachins in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 was heterologously expressed in *E. coli* and the gene product was subsequently characterized biochemically. AuaA was unequivocally demonstrated to function as a farnesyltransferase catalyzing the prenylation of 2-methyl-4-hydroxyquinoline at position C3 of the quinoline ring. The enzymatic reaction of AuaA followed apparently Michaelis-Menten-kinetics and was strictly dependent on the presence of divalent metal ions. K_M -values were determined for 2-methyl-4-hydroxyquinoline and FPP at 0.27 mM and 0.043 mM, respectively. The maximum reaction velocity V_{max} was determined at 2.21 nmol/min*mg. Like other aromatic prenyltransferases AuaA showed also flexibility towards aromatic substrates. In addition to its natural substrate 2-methyl-4-hydroxyquinoline, this membrane-bound enzyme accepted also six other 4-hydroxyquinolines and low conversion was even observed for two of six tested flavonoids. In contrast to the promiscuity towards aromatic substrates, AuaA was found to be relatively specific for FPP. GPP was accepted only with a relative activity of 3.3 % in comparison to FPP.

Selected amino acid residues in the aspartate-rich motifs, which are characteristic for membrane-bound aromatic prenyltransferases, were investigated in AuaA by site-directed mutagenesis. By mutation of the conserved aspartate residues, the importance of these residues was confirmed. Mutation of the arginine residue in the first aspartate-rich motif (NRxxDxxxD) revealed that the amino acid at this position is not directly involved in the AuaA reaction, which is in contrast to the results obtained for LePGT1, another prenyltransferase from this group.

The enzymes FgaPT2, FtmPT1 and 7-DMATS from *Aspergillus fumigatus* belong to aromatic prenyltransferases of the DMATS-family and catalyze the transfer of a prenyl moiety onto an indole ring. In contrast to membrane-bound aromatic prenyltransferases, they do not contain aspartate-rich motifs for binding of prenyl diphosphate *via* divalent metal ions and their activities are independent of the presence of metal ions. Therefore it was speculated that

basic amino acid residues in prenyltransferases of the DMATS-family coordinate the prenyl diphosphate residue. To investigate the importance of three conserved basic amino acid residues for the catalytic activities, site-directed mutagenesis experiments were carried out with FgaPT2, FtmPT1 and 7-DMATS. The results indicated that two lysine residues are involved in the prenyl transfer catalyzed by these enzymes. Mutation of arginine, the third chosen amino acid residue, led only in FgaPT2 to a strong decrease of enzyme activity, indicating that the corresponding arginine residues in FtmPT1 and 7-DMATS are not directly involved in the prenylation reactions.

After solution of the crystal structure of FgaPT2 and analyses of the enzyme complex with L-tryptophan and DMASPP, a substrate analogue to dimethylallyl diphosphate (DMAPP), a reaction mechanism was postulated. In this mechanism the amino acid residues E89, R100 and K174 should play essential roles. In order to verify this hypothesis, mutagenesis experiments of the suggested residues were carried out and the effects of the mutations on the enzyme activity were determined. Mutation of E89 and R100 confirmed the essential roles of these residues for the catalysis of FgaPT2. In contrast, substitution of K174 by glutamine did not support the importance of this residue for the postulated reaction mechanism.

Due to their flexibility towards aromatic substrates, the potential of aromatic prenyltransferases as tools for chemoenzymatic synthesis of monoprenylated tryptophan derivatives, naphthalenes, flavonoids or tyrosine derivatives was shown in several studies. In this thesis, the production of diprenylated tryptophan derivatives was demonstrated for the first time by using two soluble fungal prenyltransferases FgaPT2 and 7-DMATS. After tandem incubation of ten simple tryptophan derivatives with FgaPT2 followed by 7-DMATS not only peaks of the monoprenylated enzyme products but also further peaks could be detected by HPLC in the incubation mixtures. Best yields were obtained for L-abrine (92.7 %) and L-tryptophan (89.7 %). Three of the additional peaks were isolated and identified as C4,C7-diprenylated indole derivatives by LC-MS and NMR analyses.

Furthermore, the regiospecificity of FgaPT2 and 7-DMATS was changed by site-directed mutagenesis. Based on the information obtained from the structure of FgaPT2, derivatives of FgaPT2 and 7-DMATS were generated with substitutions of one, two or three amino acid residues and incubated with L-tryptophan in the presence of DMAPP. HPLC analysis of the incubation mixtures indicated the formation of two enzyme products in the assays with the double mutants FgaPT2_I80F_R244E and 7-DMATS_F129I_E298R. The enzyme products of 7-DMATS_F129I_E298R were isolated by HPLC and identified as 6- and 7-DMAT by NMR and MS analyses. This suggested that mutation of two amino acid residues has changed the regiospecificity of 7-DMATS.

1 Einleitung

1.1 Prenyltransferasen

Als Prenyltransferasen werden Enzyme bezeichnet, welche den Transfer von Isopreneinheiten auf Akzeptormoleküle katalysieren. Dabei werden die von allylischen Prenyldiphosphaten stammenden Prenylgruppen wie z.B. Dimethylallyl (C5), Geranyl (C10), Farnesyl (C15) oder Geranylgeranyl (C20) auf Proteine, Aromaten oder andere Isopreneinheiten übertragen. Sie sind in Bakterien, Pilzen und Pflanzen weit verbreitet und in die Biosynthese vieler Produkte des Primär- und Sekundärstoffwechsels involviert.

1.1.1 Isoprenyl-Diphosphat-Synthasen und Protein-Prenyltransferasen

Isoprenyl-Diphosphat-Synthasen (IPPS) sind in die Biosynthese linearer Isoprenyl-Diphosphate involviert, indem sie die Kettenverlängerung von allylischen Prenyldiphosphaten durch Kondensation mit homoallylischem Isopentenylidiphosphat (IPP, C5) katalysieren (Liang *et al.*, 2002). Basierend auf der Konfiguration der Isopreneinheiten ihrer Produkte lassen sie sich in *trans*- und *cis*-Prenyltransferasen einteilen. Beide Enzymgruppen unterscheiden sich stark in ihrer Primär- und Quartärstruktur sowie in den Mechanismen der von ihnen katalysierten Reaktionen (Fujihashi *et al.*, 2001; Liang, 2009; Shimizu *et al.*, 1998; Takahashi & Koyama, 2006).

trans-Prenyltransferasen, zu denen die intensiv erforschte FPP-Synthase gehört (Poulter, 2006), sind magnesiumabhängig und enthalten in ihrer Aminosäuresequenz aspartatreiche Motive (DDXXD). Durch negative Ladung der Asparaginsäurereste wird die Diphosphatgruppe des allylischen Substrates mittels Mg^{2+} koordiniert (Chang *et al.*, 2006; Tarshis *et al.*, 1994).

cis-Prenyltransferasen sind ebenfalls magnesiumabhängig, besitzen aber keine aspartatreichen Motive in ihrer Aminosäuresequenz. In diesen Enzymen wird das Magnesium durch einen einzelnen Asparaginsäurerest in einem konservierten Motiv, dem sogenannten „P-loop“, erkannt. Basierend auf Informationen aus der Kristallstruktur der Undecaprenyl-Diphosphat-Synthase (UPPS) aus *Escherichia coli* und Mutageneseversuchen wurde für *cis*-Prenyltransferasen ein Mg^{2+} -Transfermechanismus postuliert (Guo *et al.*, 2005), bei dem, anders als bei *trans*-Prenyltransferasen, FPP ohne Beteiligung von Magnesium an das Enzym gebunden wird. In der Prenylierungsreaktion übernimmt das Magnesium zwei essentielle Aufgaben. Es bildet zunächst einen Komplex mit dem homoallylischen Substrat IPP, welcher dann an das Enzym bindet. Anschließend wird das

Metallion an die Diphosphatgruppe von FPP koordiniert, wo es ihre Abspaltung ermöglicht (Guo *et al.*, 2005; Liang, 2009; Takahashi & Koyama, 2006).

Eine weitere Gruppe der Prenyltransferasen sind die Proteinprenyltransferasen. Sie spielen eine wichtige Rolle in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen in Eukaryoten, indem sie z.B. das Kohlenstoffgerüst von FPP oder GGPP auf einen Cysteinrest am oder in der Nähe des C-Terminus übertragen (Maurer-Stroh *et al.*, 2003). Enzyme, die solche Reaktionen katalysieren, sind die Farnesyltransferase (FTase), Geranylgeranyltransferase I (GGTase I) und Rab-Geranylgeranyltransferase (RabGGTase bzw. GGTase II). Diese löslichen Prenyltransferasen sind zinkabhängig und besitzen keine aspartatreichen Motive in ihrer Aminosäuresequenz. FTase und GGTase I übertragen die Prenylreste auf einen konservierten Cysteinrest im C-terminalen CaaX-Motiv von Proteinen und Peptiden und werden als CaaX-Prenyltransferasen bezeichnet, während die RabGGTase zwei Geranylgeranylgruppen vom GPP auf Cysteinreste in Motiven xCCxx, xxCxC, xxCCx, xxxCC, xCxxx oder CCxxx am C-Terminus von Rab-Proteinen transferiert (Crowell & Huizinga, 2009).

Für die biologische Funktion vieler Proteine ist ihre Lokalisierung in oder an der Membran eine wichtige Voraussetzung. Proteinprenylierung ermöglicht die Verankerung von Proteinen mittels hydrophober Isoprenoidreste in oder an der Membran und erlaubt ihnen so, dort ihre biologische Funktion zu erfüllen (Nguyen *et al.*, 2010). Des Weiteren spielen Prenylreste eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen (Houglund & Fierke, 2009; Sinensky, 2000).

1.1.2 Aromatische Prenyltransferasen

Aromatische Prenyltransferasen katalysieren den Transfer allylischer Isopreneinheiten auf aromatische Akzeptormoleküle. Sie sind die Schlüsselenzyme in der Biosynthese vieler Primärmetabolite und tragen ebenfalls zu einer großen Vielfalt von Sekundärstoffen bei. Basierend auf ihren Aminosäuresequenzen und biochemischen Eigenschaften lassen sich aromatische Prenyltransferasen in mindestens drei nachfolgend beschriebene Gruppen einteilen (Brandt *et al.*, 2009; Heide, 2009a).

Membrangebundene Prenyltransferasen kommen in verschiedenen Organismen vor und sind sowohl in den Primär- als auch den Sekundärstoffwechsel involviert. Gut charakterisierte Mitglieder dieser Gruppe sind die zuerst entdeckten aromatischen Prenyltransferasen UbiA aus *E. coli* und Coq2 aus *Saccharomyces cerevisiae*, welche eine zentrale Rolle in der Biosynthese von Ubichinon spielen (Ashby *et al.*, 1992; Melzer & Heide, 1994). Mittlerweile wurden einige weitere membrangebundene Prenyltransferasen charakterisiert, welche an der Biosynthese verschiedener Sekundärmetabolite beteiligt sind.

Als Beispiele sind die Enzyme SfN8DT (Sasaki *et al.*, 2008), SfG6DT und SfiLDT (Sasaki *et al.*, 2011) in der Biosynthese von Flavonoiden in *Sophora flavescens* zu nennen oder LePGT1 aus *Lithospermum erythrorhizon* (Yazaki *et al.*, 2002), das bei der Biosynthese von Shikonin eine wichtige Rolle spielt. All diese Enzyme enthalten, wie die zuvor beschriebenen *trans*-Prenyltransferasen, mindestens zwei aspartatreiche Motive und ihre Aktivität ist strikt abhängig von divalenten Metallionen. Da es sich bei diesen Prenyltransferasen um integrale Membranproteine handelt, ist es bisher noch nicht gelungen, ihre räumliche Struktur aufzuklären. Es wurden jedoch Versuche unternommen, computergestützte Strukturmodelle anhand bisher bekannter Strukturen von magnesiumabhängigen Prenyltransferasen wie der FPP-Synthase zu erstellen. Als Ergebnis wurden die Modelle von UbiA und LePGT1 publiziert (Bräuer *et al.*, 2008; Ohara *et al.*, 2009).

Eine weitere Gruppe aromatischer Prenyltransferasen umfasst lösliche Enzyme wie CloQ aus *Streptomyces roseochromogenes* in der Biosynthese von Clorobiocin (Pojer *et al.*, 2003) oder NovQ aus *S. spheroides* in der Biosynthese von Novobiocin (Steffensky *et al.*, 2000). Ein weiteres Beispiel ist NphB aus *Streptomyces* sp. CL 190, in der Naphterpin-Biosynthese (Kumano *et al.*, 2008). Enzyme dieser sogenannten CloQ/NphB-Gruppe zeigen keine Sequenzähnlichkeiten zu den membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen und weisen außerdem keine aspartatreichen Motive auf. Ihre Aktivität ist, mit Ausnahme von NphB, unabhängig von divalenten Metallionen (Tello *et al.*, 2008). Strukturanalysen von NphB und CloQ zeigten, dass die Erkennung und Koordination des Prenyldiphosphates direkt durch basische Aminosäurereste erfolgt und dass beide Enzyme eine gemeinsame Architektur besitzen, die aus α - α - β - β -Elementen besteht und als „Prenyltransferase-barrel“ bezeichnet wird (Kuzuyama *et al.*, 2005; Metzger *et al.*, 2010).

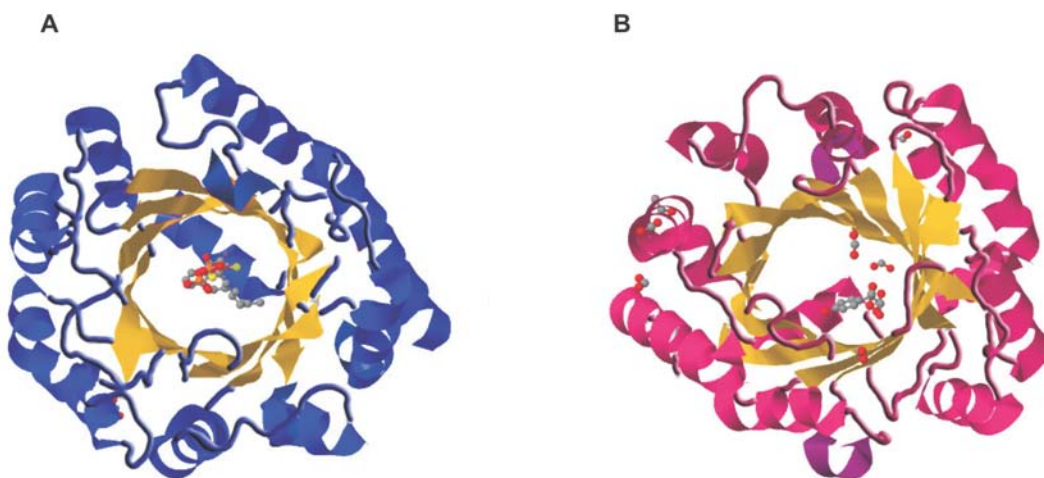


Abbildung 1-1: Dreidimensionale Strukturen von A) NphB (PDB-Nr.: 1ZB6) aus *Streptomyces* sp. CL190 (Kuzuyama *et al.*, 2005) und B) CloQ (PDB-Nr.: 2XM7) aus *Streptomyces roseochromogenes* var. *oscitans* (Metzger *et al.*, 2010). Beide Enzyme besitzen eine gemeinsame Architektur in Form eines Prenyltransferase-barrels.

Im Laufe der letzten Jahre sind zahlreiche weitere lösliche Prenyltransferasen charakterisiert und identifiziert worden, welche hauptsächlich die Prenylierung von Indolderivaten katalysieren (Li, 2010; Steffan *et al.*, 2009). Wie die löslichen Prenyltransferasen der CloQ/NphB-Gruppe enthalten diese Enzyme keine aspartatreichen Motive und ihre Aktivität ist unabhängig von divalenten Metallionen. Auf der Sequenzebene unterscheiden sie sich jedoch deutlich von allen zuvor beschriebenen Prenyltransferasen. Da sie klare Sequenzähnlichkeiten zu der 4-Dimethylallyltryptophansynthase (4-DMATS) aus *Claviceps purpurea* zeigen, welche den ersten Schritt in der Biosynthese von Ergotalkaloiden katalysiert (Tsai *et al.*, 1995), wird diese Enzymgruppe als „DMATS-Superfamilie“ bezeichnet (Haug-Schifferdecker *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011).

Eine Reihe von Enzymen aus dieser Gruppe wurde aus dem Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* charakterisiert. Dazu gehören unter anderem FgaPT1 (Unsöld & Li, 2006), FgaPT2 (Unsöld & Li, 2005), 7-DMATS (Kremer *et al.*, 2007), FtmPT1 (Grundmann & Li, 2005), FtmPT2 (Grundmann *et al.*, 2008) und CdpNPT (Yin *et al.*, 2007). Weitere Vertreter dieser Enzymgruppe sind 5-DMATS aus *A. clavatus* (Yu *et al.*, 2012), AnaPT und CdpC3PT aus *Neosartorya fischeri* (Yin *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2010), CTrpPT aus *A. oryzae* (Zou *et al.*, 2010), TdiB aus *A. nidulans* (Schneider *et al.*, 2008), MaPT aus *Malbranchea aurantiaca* (Ding *et al.*, 2008) und SirD aus *Leptosphaeria maculans* (Kremer & Li, 2010).

Diese Enzyme zeigen Sequenzidentitäten von 23 bis 67 % zueinander (Tabelle 1-1) und können sich in ihrer Substrat- oder Regiospezifität voneinander unterscheiden.

Tabelle 1-1: Sequenzidentitäten einiger pilzlicher Prenyltransferasen der DMATS-Familie.

	FgaPT2	7-DMATS	FtmPT1	FtmPT2	CdpNPT	5-DMATS	CdpC3PT	AnaPT	CTrpPT	TdiB	MaPT	SirD
FgaPT1	28	26	24	26	26	29	31	25	29	24	29	24
FgaPT2		31	35	37	31	52	35	31	35	24	64	31
7-DMATS			28	29	25	28	31	29	28	24	30	34
FtmPT1				30	28	35	34	29	31	20	35	24
FtmPT2					28	39	32	31	31	24	35	25
CdpNPT						33	53	31	37	24	31	35
5-DMATS							35	32	39	29	50	27
CdpC3PT								32	44	26	36	35
AnaPT									33	26	31	67
CTrpPT										23	35	50
TdiB											26	24
MaPT												29

FgaPT1 (Acc.No. XP_756136), FgaPT2 (AAX08549), 7-DMATS (ABS89001), FtmPT1 (AAX56314), FtmPT2 (EU622826), CdpNPT (ABR14712) und 5-DMATS (XP_001269817) sind aus *Aspergillus fumigatus*, CdpC3PT (XP_59405) und AnaPT (EAW16181) aus *Neosartorya fischeri*, CTrpPT (ADI60056) aus *A. oryzae*, TdiB (ABU51603) aus *A. nidulans*, MaPT (ABZ80612) aus *Malbranchea aurantiaca* und SirD aus *Leptosphaeria maculans* (AAS92554).

Das Enzym FgaPT2 z.B. ist eine 4-Dimethylallyltryptophansynthase und katalysiert den ersten Schritt in der Fumigaclavin C-Biosynthese durch Übertragung des Prenylrests von DMAPP auf L-Tryptophan an Position C4 des Indolrings (Wallwey & Li, 2011). Wie in Abbildung 1-2 dargestellt, entsteht als Produkt der Reaktion 4-L-Dimethylallyltryptophan (4-L-DMAT).

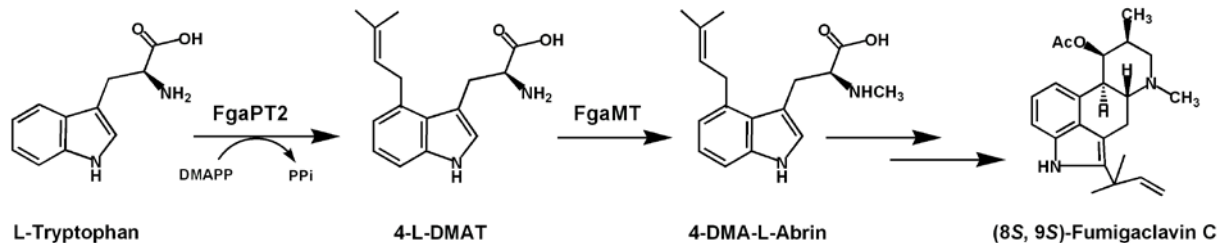


Abbildung 1-2: Vereinfachtes Schema der Biosynthese von Fumigaclavin C in *A. fumigatus*.

Die Prenyltransferase 7-DMATS verwendet ebenfalls L-Tryptophan und DMAPP als Substrate, fügt jedoch den Prenylrest regiospezifisch an Position C7 des Indolrings an (Abbildung 1-3). Das Endprodukt des Genclusters, in dem sich das für 7-DMATS kodierende Gen befindet, ist bisher nicht bekannt. Die bioinformatische Analyse der restlichen in dem Cluster lokalisierten Gene lässt jedoch ein zyklisches Dipeptid als End- oder Zwischenprodukt vermuten, welches N-methyliertes Tryptophan enthält (Steffan *et al.*, 2009).

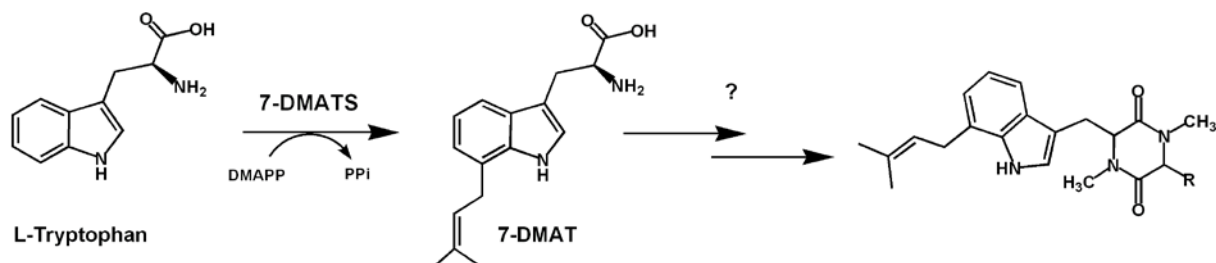


Abbildung 1-3: Enzymatische Reaktion katalysiert von 7-DMATS.

Das Enzym FtmPT1 prenyliert sein natürliches Substrat Brevianamid F an Position C2 des Indolrings, wobei Tryprostatin B entsteht, und ist an der Biosynthese des Mycotoxins Verruculogen beteiligt (Abbildung 1-4).

Die Verknüpfung des Prenylrests kann also zum einen an verschiedenen Positionen im jeweiligen Substrat erfolgen, zum anderen kann die Prenylgruppe entweder regulär oder revers an das Substrat angefügt werden (Li, 2010).

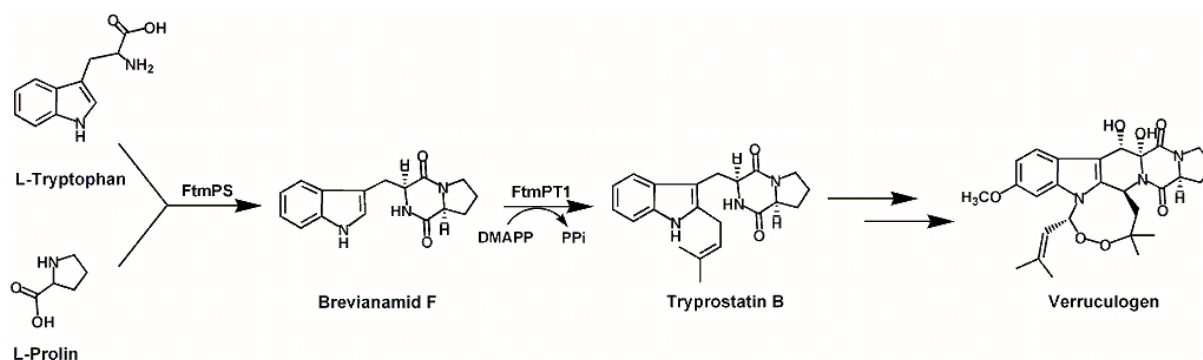


Abbildung 1-4: Vereinfachtes Schema der Biosynthese von Fumitremorgin B in *A. fumigatus*.

Durch intensive Kristallisationsversuche ist es gelungen, die erste räumliche Struktur eines Enzyms dieser Gruppe aufzuklären. Dabei handelte es sich um die Prenyltransferase FgaPT2 (Metzger *et al.*, 2009). Die Kristallisation lieferte unerwartete Erkenntnisse, denn obwohl FgaPT2 keine Sequenzähnlichkeiten zu Enzymen aus der CloQ/NphB-Gruppe aufweist, besitzen diese Proteine eine gemeinsame Architektur in Form des „Prenyltransferase-barrels“.

Kurze Zeit später wurde die 3D-Struktur von FtmPT1 veröffentlicht (Jost *et al.*, 2010). Auch dieses Enzym besitzt trotz fehlender Sequenzähnlichkeiten zu Enzymen der NphB/CloQ-Gruppe dieselbe Architektur.

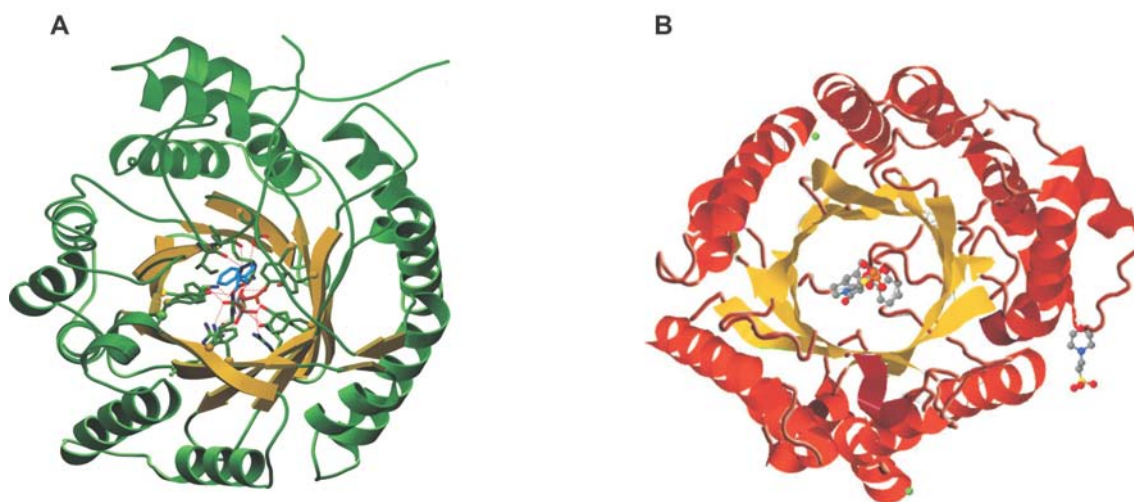


Abbildung 1-5: Dreidimensionale Strukturen von A) FgaPT2 (modifiziert nach Metzger *et al.*, 2009), PDB-Nr.: 3I4X und B) FtmPT1 (Jost *et al.*, 2010), PDB-Nr.: 3O2K.

1.2 Prenylierte aromatische Substanzen

Durch Prenylierung aromatischer Verbindungen entsteht eine große Vielfalt an Naturstoffen, die eine wichtige Rolle im Primär- und Sekundärstoffwechsel von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren spielen. Prenylierung kann einer Substanz biologische Aktivität verleihen oder vorhandene biologische Aktivität erhöhen. Einer der dafür vermuteten Gründe ist die aus dem Anfügen einer Isopreneinheit resultierende erhöhte Lipophilität und dadurch auch Membranpermeabilität (Koeduka *et al.*, 2011).

1.2.1 Primärmetabolite

Der Primärstoffwechsel umfasst grundlegende Prozesse für das Wachstum eines Organismus sowie für die Energiebereitstellung und –transformation. Primärmetabolite sind Substanzen, welche für die Erhaltung, das Wachstum und die Reproduktion essentiell sind. Dazu zählen unter anderem die Biopolymere und ihre Bausteine sowie makromolekulare Suprastrukturen der Zelle und der Zellorganellen (Ammon & Hunnius, 2010).

Eine große Gruppe prenylierter Primärmetabolite stellen Ubichinone, Plastochinone, Menachinone sowie Tocopherole dar (Abbildung 1-6).

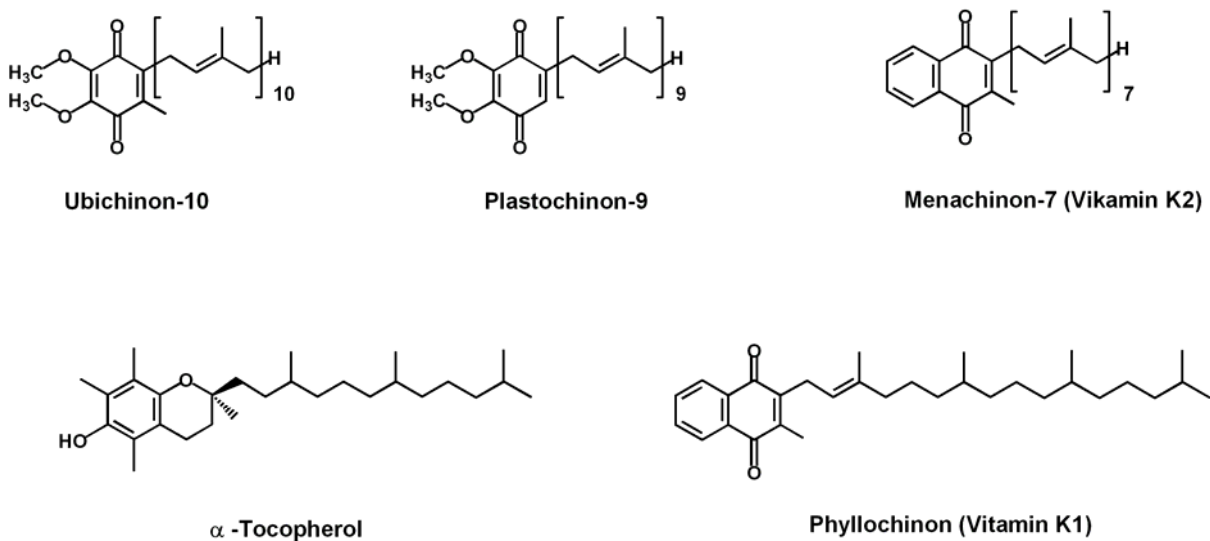


Abbildung 1-6: Chemische Strukturen einiger prenylierter aromatischer Primärmetabolite.

Bei den oben genannten Chinonen handelt es sich um essentielle Elektronenüberträger in energieerzeugenden Prozessen wie Atmung und Photosynthese. Ubichinone kommen als Elektronenüberträger in der Atmungskette von eukaryotischen Mitochondrien und einigen Bakterien vor (Nowicka & Kruk, 2010), während Menachinone ihre Aufgabe hauptsächlich in

anaeroben Elektronentransportsystemen erfüllen (Kelly *et al.*, 2001). Plastochinon-9 gehört zu der Gruppe der Plastochinone und ist ein wichtiges Isoprenoidlipid in Chloroplasten. Dort vermittelt es den Elektronenfluss in Pflanzen und Grünalgen (Sadre *et al.*, 2010). Phyllochinon ist in allen lebenden Organismen zu finden. Während es in Pflanzen und einigen Mikroorganismen als Elektronenakzeptor in der Photosynthese fungiert, spielt es im Tierreich eine wichtige Rolle in der Regulation von Blutgerinnung. Tocopherole funktionieren als membranassoziierte Antioxidantien, welche als Radikalfänger mehrfach ungesättigte Fettsäuren vor einer Zerstörung durch Oxidation schützen (Collakova & DellaPenna, 2001; Gill & Tuteja, 2010; Schledz *et al.*, 2001).

1.2.2 Sekundärmetabolite

Im Gegensatz zu den Primärmetaboliten sind Sekundärmetabolite als niedermolekulare Substanzen definiert, die von lebenden Organismen gebildet und nicht direkt für Wachstum und Reproduktion ihrer Produzenten benötigt werden. Sie können dem jeweiligen Produzenten Vorteile verschaffen und weisen oft biologische und pharmakologische Aktivitäten auf. Sie können z.B. von Pflanzen als Schutz vor Fraßfeinden und Pathogenen oder als Lockstoffe für Bestäuber eingesetzt werden. Von Mikroorganismen gebildete Sekundärstoffe, wie verschiedene Antibiotika, Antimycotika und Toxine, weisen häufig antimikrobielle Eigenschaften auf. Es wird vermutet, dass sie ausgeschieden werden, um dem Produzenten einen Vorteil bei der Konkurrenz um Lebensraum zu verschaffen (Losada *et al.*, 2009).

1.2.2.1 Prenylierte Sekundärmetabolite aus Bakterien

Die filamentösen, Gram-positiven Bakterien der Gattung *Streptomyces* sind für die Bildung einer Vielzahl von bakteriellen Sekundärmetaboliten bekannt. Neben anderen Sekundärmetaboliten stammen etwa zwei Drittel der natürlich vorkommenden Antibiotika aus Streptomyceten (Berdy, 2005). Darunter befinden sich die Aminocoumarine, wie Novobiocin und Clorobiocin aus *S. spheroides* und *S. roseochromogenes*. Diese Naturstoffe gelten als potente Inhibitoren der bakteriellen Gyrase (Heide, 2009b), indem sie mit der B-Untereinheit des Enzyms interagieren und so die ATP-abhängige DNA-Überspiralisierung verhindern. Sie besitzen eine charakteristische chemische Struktur, welche einen 3-Amino-4,7-Dihydroxycoumarinring enthält sowie einen C5-prenylierten 4-Hydroxybenzoylrest, der mit der Aminogruppe der Aminocoumarineinheit über eine Amidbindung verknüpft ist (Abbildung 1-7). Die Gencluster für die Biosynthese von Clorobiocin und Novobiocin sind bekannt und die einzelnen Syntheseschritte nahezu vollständig aufgeklärt (Heide, 2009b).

Die Prenylierung von 4-Hydroxybenzoesäure wird von den aromatischen Prenyltransferasen CloQ und NovQ katalysiert (Ozaki *et al.*, 2009; Pojer *et al.*, 2003).

Eine weitere Gruppe von Bakterien, die für Produktion von vielen Sekundärmetaboliten bekannt sind, sind die Gram-negativen Myxobakterien. Das fruchtkörperbildende, im Boden und auf unlöslichen organischen Substraten lebende Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 produziert viele solcher Naturstoffe mit einzigartigen Strukturen und biologischen Aktivitäten (Wenzel & Muller, 2007). Dazu gehört neben den Stigmatellinen, Myxalamiden und Myxochelinen eine Gruppe von Aurachinen (Abbildung 1-7). Aurachine sind seltene Chinolinalkaloide, die mit einer Isoprenoidseitenkette ausgestattet sind (Kunze *et al.*, 1987; Wenzel & Muller, 2007). Wie viele andere prenylierte Naturstoffe zeigen auch Aurachine biologische Aktivität, indem sie beispielsweise das Wachstum von Gram-positiven Bakterien und Pilzen hemmen (Kunze *et al.*, 1987) oder den Elektronentransport in der Atmungskette inhibieren, was auf ihre strukturelle Ähnlichkeit mit Vitamin K zurückzuführen ist.

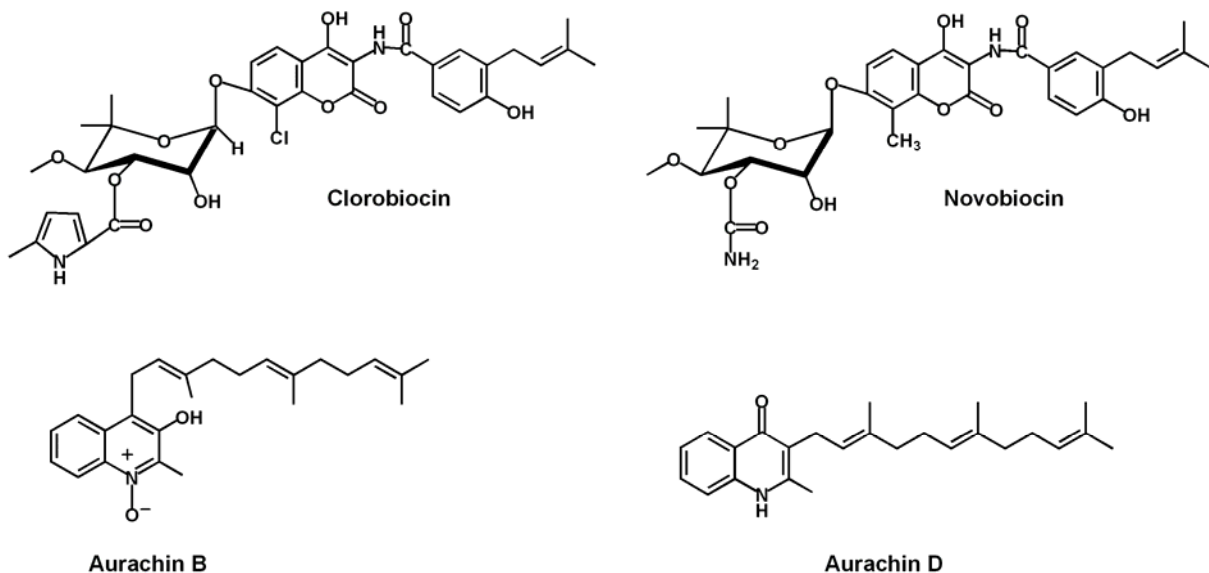


Abbildung 1-7: Chemische Strukturen einiger prenylierter Sekundärmetabolite aus Bakterien.

Bis vor kurzem waren die für die Aurachin-Biosynthese verantwortlichen Gene in *S. aurantiaca* unbekannt. Zuvor durchgeführte Fütterungsstudien haben gezeigt, dass die Biosynthese von Aurachinen von Anthranilat ausgeht (Silakowski *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein putativer Biosyntheseweg für Aurachine aufgestellt. Im Jahr 2007 wurde von Sandmann *et al.* das aus elf offenen Leserastern (ORFs) bestehende Aurachin-Biosynthesecluster aus *S. aurantiaca* identifiziert. Durch Homologievergleiche konnten mögliche Funktionen für fünf der Genprodukte (AuaA-AuaE) postuliert werden. Da AuaA Sequenzähnlichkeiten zu der membrangebundenen Prenyltransferase UbiA zeigt,

wurde es als eine Prenyltransferase vorgeschlagen, die die Bildung von Aurachin D durch Prenylierung von 2-Methyl-4-Hydroxychinolin katalysiert (Abbildung 1-8).

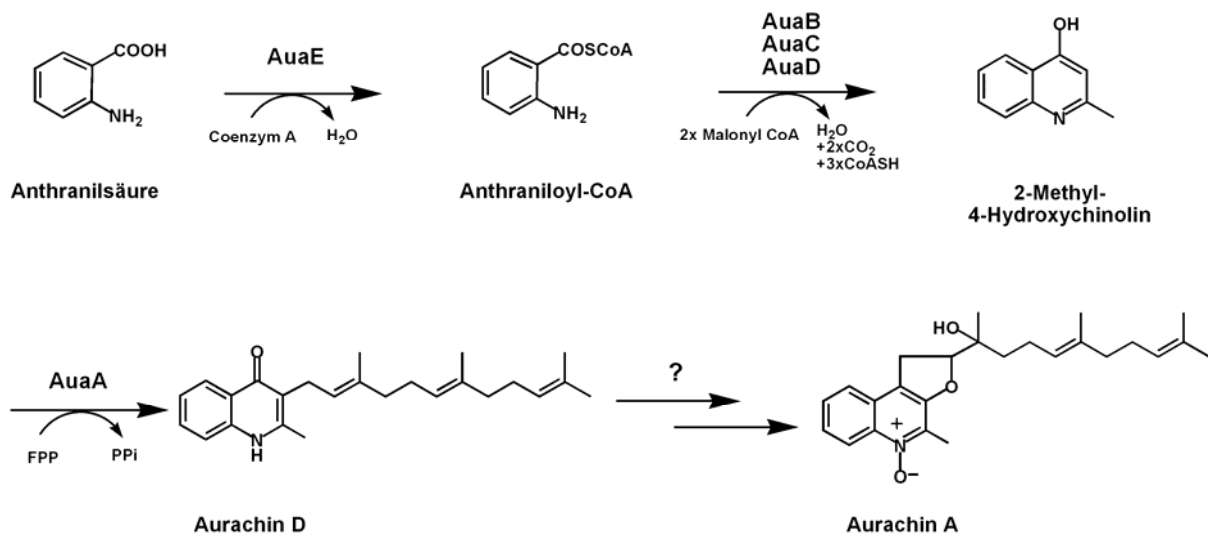


Abbildung 1-8: Vereinfachter putativer Biosyntheseweg für Aurachine.

1.2.2.2 Prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen

Eine große Gruppe von Naturstoffen stellen prenylierte Indolalkaloide aus Pilzen dar. Es handelt sich hierbei um Verbindungen mit einem von L-Tryptophan oder seinen Vorstufen abgeleiteten Indol- bzw. Indolin- und einem Prenyl-Bestandteil. Sie werden unter anderem von Ascomyceten der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Claviceps* produziert (Li, 2010; Stocking *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000). Zu diesen prenylierten Indolderivaten zählen etliche Vertreter mit diversen chemischen Strukturen, die im Gegensatz zu ihren unprenylierten aromatischen Vorstufen häufig biologische und pharmakologische Aktivitäten aufweisen (Usui *et al.*, 1998). In Abbildung 1-9 sind einige Beispiele für prenylierte Indolderivate aus verschiedenen Pilzen dargestellt.

Ergotamin gehört zu den Ergotalkaloiden, den bedeutendsten Toxinen und Pharmaka natürlichen Ursprungs (Schardl *et al.*, 2006; Wallwey *et al.*, 2010). Es ist ein Hauptalkaloid im Mutterkorn, dem Sklerotium von *Claviceps purpurea* auf Roggen. In Europa war es im Mittelalter für Ergotismus oder das „Antoniusfeuer“ verantwortlich, bei dem viele Menschen durch Aufnahme der pilzkontaminierten Lebensmittel den Tod erlitten (Schiff, 2006; Strickland *et al.*, 2011). Heute wird Ergotamin und auch sein semi-synthetisches Derivat Dihydroergotamin bei der Behandlung akuter Migräne und Cluster-Kopfschmerzen eingesetzt (Robertson *et al.*, 2010; Saper & Silberstein, 2006; Wallwey *et al.*, 2010). Fumigaclavin C wird von verschiedenen *Aspergillus*-Stämmen produziert (Ma *et al.*, 2006; Wallwey *et al.*, 2010) und zeigt eine Reihe von biologischen Aktivitäten. Neben der bei

Ratten nachgewiesenen vasorelaxierenden Wirkung (Ma *et al.*, 2006) zeigt Fumigaclavin C auch eine positive Wirkung bei Leberschäden und Colitis in Mäusen (Wu *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004). Ferner hemmt es die Expression einiger inflammatorischer Cytokine wie TNF- α und die Bindung von Lymphozyten an die zelluläre Matrix (Zhao *et al.*, 2004).

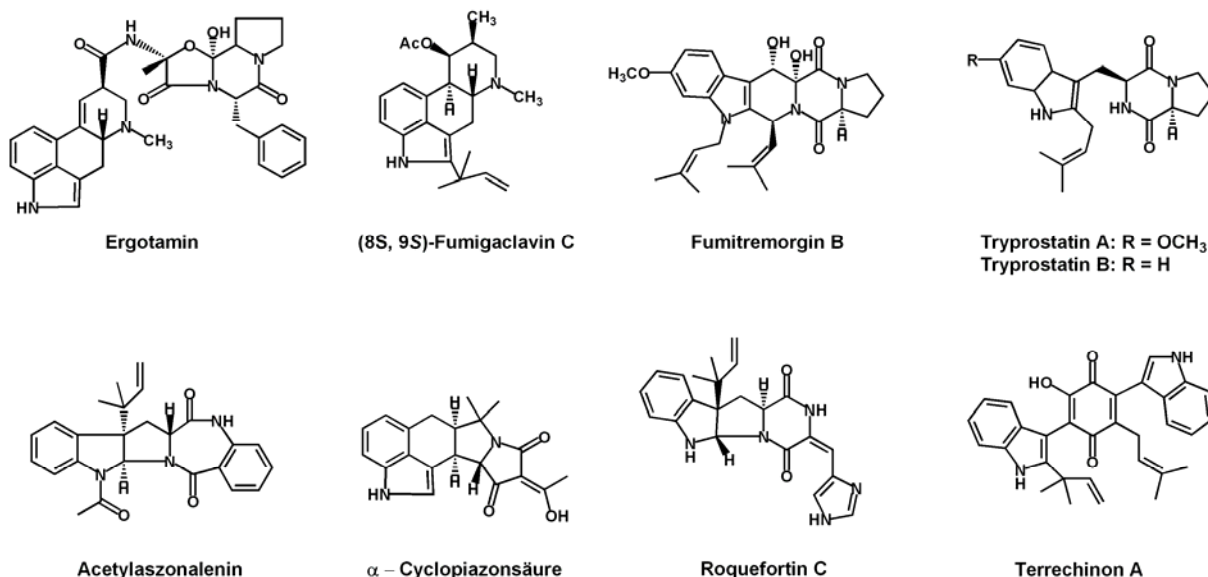


Abbildung 1-9: Chemische Strukturen einiger prenylierter Indolderivate aus Schimmelpilzen.

Fumitremorgin B ist ein tremorgenes Mycotoxin und wird ebenfalls von einigen Pilzen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* produziert. Zu seinen Produzenten gehören unter anderem *A. fumigatus* (Li, 2010), *P. piscarium* Westling (Gallagher & Latch, 1977) und *P. verruculosum* (Vleggaar *et al.*, 1993).

Tryprostatine A und B sind zwei Intermediate, welche während der Biosynthese von Fumitremorgin B entstehen. Beide Tryprostatine weisen hohe Cytotoxizität bei verschiedenen Krebszelllinien auf (Cui *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2002). Tryprostatin A ist z.B. in der Lage, den ABC-Transporter BRCP (breast cancer resistance protein) von multiresistenten Tumorzellen zu hemmen und dadurch eine Angriffsmöglichkeit für andere Cytostatika zu schaffen (Jain *et al.*, 2008; Woehlecke *et al.*, 2003). Wegen dieser Eigenschaften sind beide Naturstoffe interessant für die Krebsforschung.

Das Mycotoxin Acetylaszonalenin wird genau wie sein nicht-acetyliertes Derivat Aszonalenin in verschiedenen Pilzen produziert (Capon *et al.*, 2003; Hayashi *et al.*, 2007; Wakana *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2009).

Weitere interessante Mycotoxine sind α -Cyclopiazonsäure und Roquefortin C. Die α -Cyclopiazonsäure konnte in verschiedenen *Aspergillus* und *Penicillium*-Stämmen nachgewiesen werden (Dorner, 2002) und ist ein starker Inhibitor der Ca²⁺-ATPase des

sarkoplasmatischen Retikulums (Kito & Suzuki, 2003; Monocoq *et al.*, 2007). Roquefortin C wurde zuerst aus *Penicillium roquefortii* isoliert (Scott & Kennedy, 1976). Später konnte es auch in vielen anderen *Penicillium*-Stämmen nachgewiesen werden (de la Campa *et al.*, 2007; Finoli *et al.*, 2001; Moldes-Anaya *et al.*, 2011). Terrechinon A aus *A. terreus* und *A. nidulans* sowie andere Asterrechinone weisen antidiabetische, antitumorale und antiretrovirale Aktivitäten auf (Balibar *et al.*, 2007; Bouhired *et al.*, 2007; Fredenhagen *et al.*, 1997; He *et al.*, 2004).

1.2.2.3 Prenylierte Sekundärmetabolite aus Pflanzen

Eine Vielzahl von Naturstoffen mit einer oder mehreren Prenylgruppen wurden ebenfalls aus höheren Pflanzen isoliert. Auch hier ist die Prenylierung für eine große Diversität von chemischen Strukturen und biologischen Aktivitäten verantwortlich (Sasaki *et al.*, 2008; Yazaki *et al.*, 2009).

Ein Beispiel für einen pflanzlichen prenylierten Naturstoff mit verschiedenen biologischen Aktivitäten stellt Shikonin dar. Dieses rote Naphthochinon und seine Derivate werden von *Lithospermum erythrorhizon* und anderen Boraginaceen produziert (Yazaki *et al.*, 2002) und zeigen antimikrobielle, antioxidative und antitumor Aktivitäten (Chen *et al.*, 2002; Efferth *et al.*, 2007). Viele Pflanzen produzieren nach einer Infektion durch Mikroorganismen (Bakterien oder Pilze) sogenannte Phytoalexine, um das mikrobielle Wachstum und die Ausbreitung zu hemmen (Pedras *et al.*, 2011). Glyceolline aus der Sojabohne *Glycine max* sind prenylierte Phytoalexine, die neben ihren antibakteriellen und antifungalen Aktivitäten auch antiproliferative Wirkung auf Krebszellen sowie antiöstrogene Eigenschaften aufweisen (Ng *et al.*, 2011; Zimmermann *et al.*, 2010). Interessante biologische Eigenschaften wurden auch für eine Reihe prenylierter Flavonoide aus Pflanzen beschrieben. So wirkt 8-Dimethylallylnaringenin als starkes Phytoestrogen und ist somit ein Kandidat für den Einsatz gegen Osteoporose (Tielens *et al.*, 2008). Xanthohumol ist ein weiteres wichtiges prenyliertes Flavonoid mit verschiedenen biologischen Aktivitäten und zeigt unter anderem eine antioxidative, antiöstrogene und antitumor Wirkung (Gerhauser *et al.*, 2002; Hartkorn *et al.*, 2009). Chemische Strukturen der in diesem Abschnitt vorgestellten prenylierten Verbindungen sind in Abbildung 1-10 dargestellt.

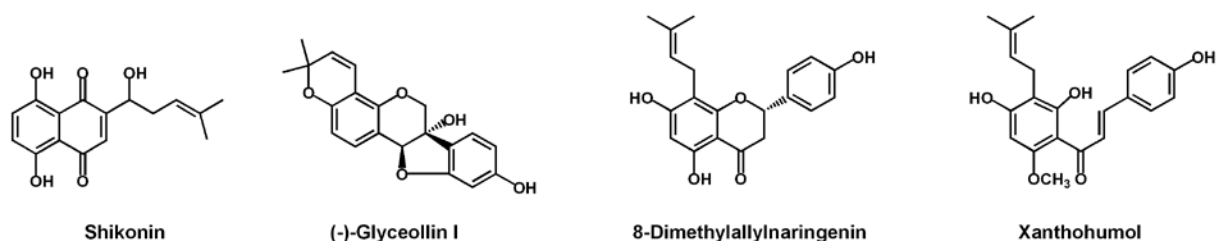


Abbildung 1-10: Strukturen einiger prenylierter Sekundärmetabolite aus Pflanzen.

1.2.3 Chemoenzymatische Synthese von prenylierten Indolalkaloiden

Ungefähr 50 % der heute eingesetzten Arzneimittel sind Naturstoffe oder in Anlehnung an die Natur synthetisierte Verbindungen (Camp *et al.*, 2011). Bei der Suche nach neuen Substanzen mit interessanten biologischen Aktivitäten spielen neben der traditionellen organischen Synthese weitere Technologien zunehmend eine Rolle. Dazu gehören unter anderem kombinatorische und chemoenzymatische Biosynthese sowie die Mutasynthese.

Unter kombinatorischer Biosynthese versteht man ein Verfahren, bei dem genetische Informationen in der Biosynthese von Naturstoffen ergänzt oder neu kombiniert werden, um neue, veränderte Verbindungen zu erhalten (Floss, 2006). In der chemischen Synthese werden strukturell unterschiedliche Analoga biosynthetischer Vorstufen oder Intermediate erzeugt. Dieser Prozess wird in der Mutasynthese mit der Fähigkeit der Gentechnologie, Mutanten zu Erzeugen, die in der Biosynthese oder Verwertung der natürlichen Vorstufen oder Intermediate defekt sind, kombiniert (Süssmuth *et al.*, 2011). Durch diese Methode ist es einerseits den Mikroorganismen möglich, alternative Substrate effizient zu verwenden, andererseits erleichtert die Abwesenheit der natürlichen Produkte die Isolierung der entstehenden neuen Produkte. Mit Hilfe dieser Technik konnten einige biologisch aktive Substanzen produziert werden (Kennedy, 2008; Weissman, 2007).

Bei der chemoenzymatischen Synthese dagegen handelt es sich um ein *in vitro* Verfahren zur Produktion von Substanzen mit Hilfe von rekombinanten Enzymen. Aufgrund einiger Vorteile gegenüber der konventionellen chemischen Synthese (niedrige Reaktions-temperaturen, nahezu neutrale pH-Werte, kein Anfügen von Schutzgruppen an funktionelle Gruppen) hat dieses Verfahren in den letzten Jahren an Popularität gewonnen und wurde erfolgreich zur Synthese vieler neuer Substanzen wie Peptiden (Gopishetty *et al.*, 2008), Glykosiden (Yu *et al.*, 2010) und Glykopeptiden (Wu *et al.*, 2010) eingesetzt. Eine wichtige Voraussetzung für chemoenzymatische Synthese ist eine breite Substratspezifität der eingesetzten Enzyme (Koeller & Wong, 2001). Etliche charakterisierte aromatische Prenyltransferasen aus der DMATS-Familie erfüllen diese Voraussetzung und eignen sich somit gut als Werkzeuge zur Herstellung neuer prenylierter Substanzen mit vielleicht interessanten biologischen und pharmakologischen Aktivitäten. Intensive Untersuchungen der charakterisierten Prenyltransferasen haben gezeigt, dass diese Enzyme eine hohe Flexibilität gegenüber ihren aromatischen Substraten aufweisen, obwohl sie ausschließlich DMAPP als Prenyldonor verwenden (Grundmann & Li, 2005; Kremer *et al.*, 2007; Li, 2010; Steffan *et al.*, 2009; Steffan *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2012). Diese Eigenschaft wurde genutzt, um eine Reihe von einfach prenylierten Tryptophanderivaten und zyklischen Dipeptiden zu produzieren (Li, 2010). Untersuchungen zur Substratspezifität zeigten, dass einige Enzyme häufig dieselben Substrate akzeptieren, diese aber regiospezifisch an verschiedenen Positionen prenylieren. FgaPT2, 5-DMATS und 7-DMATS zum Beispiel,

katalysieren die Prenylierung von einfachen Tryptophanderivaten sowie von einigen zyklischen Dipeptiden an Positionen C4 (FgaPT2), C5 (5-DMATS) und C7 (7-DMATS) des Indolrings. Als weitere Beispiele können die Prenyltransferasen FtmPT1 und CdpC3PT genannt werden, die verschiedene zyklische Dipeptide an Position C2 (FtmPT1) oder an Position C3 (CdpC3PT) prenylieren (Grundmann & Li, 2005; Yin *et al.*, 2010). Durch Einsatz verschiedener Prenyltransferasen können also ausgehend von einem einfachen Indolderivat unterschiedliche Derivate produziert werden, welche die Prenylreste an verschiedenen Positionen tragen. In Abbildung 1-11 ist eine Übersicht über die von pilzlichen Prenyltransferasen der DMATS-Familie katalysierten Prenylierungsreaktionen dargestellt.

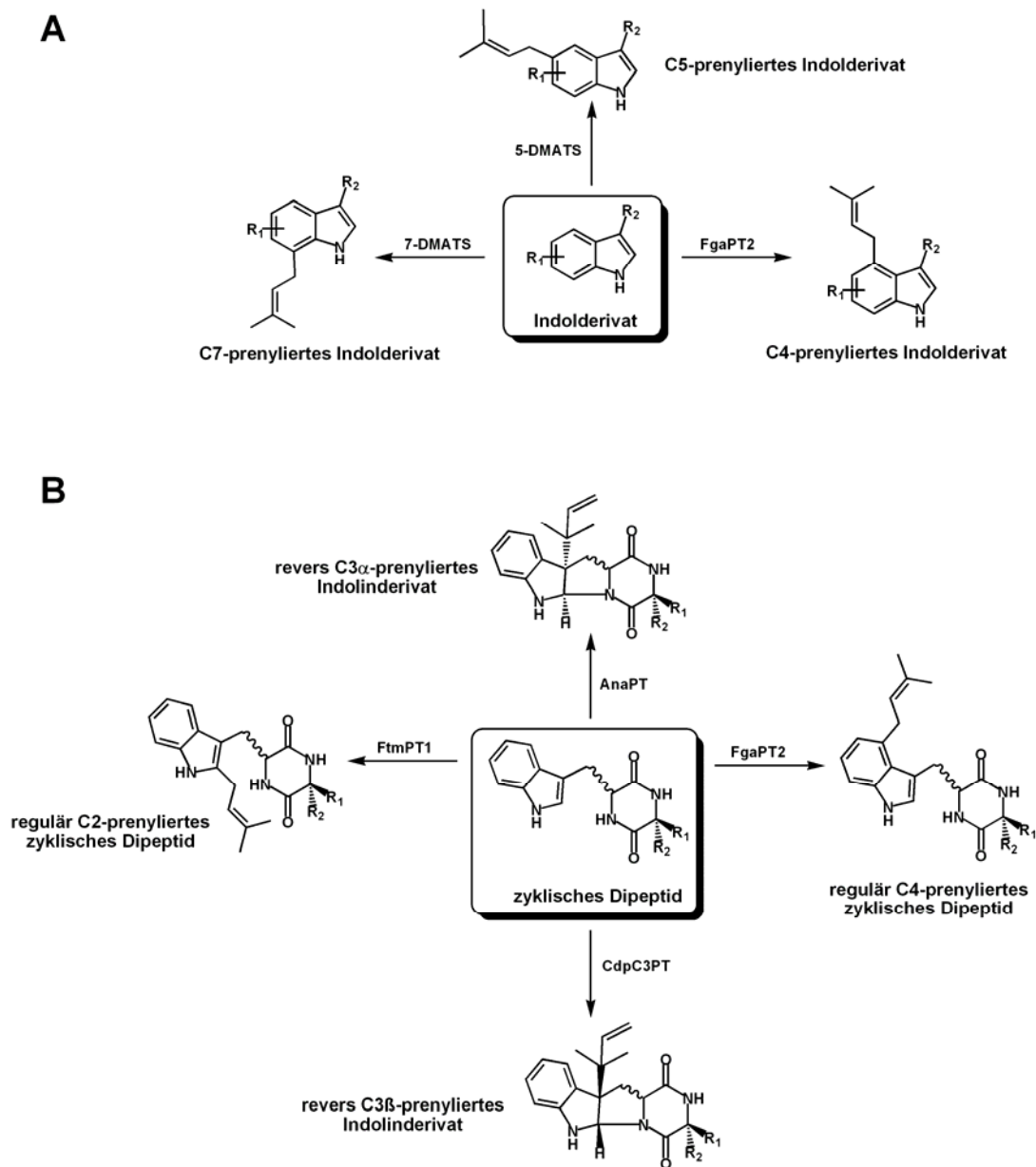


Abbildung 1-11: Chemoenzymatische Synthese von prenylierten Indolderivaten mit Hilfe der pilzlichen aromatischen Prenyltransferasen der DMATS-Familie modifiziert nach Li, 2010. A) Synthese von prenylierten einfachen Indolderivaten, B) Synthese von prenylierten zyklischen Dipeptiden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Klonierung und Charakterisierung der Farnesyltransferase AuaA aus dem Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15

Im Arbeitskreis von Prof. Müller aus Saarbrücken wurde das Aurachin-Biosynthesecuster identifiziert, welches das Gen *auaA* enthielt, das für eine putative membrangebundene Prenyltransferase kodierte. Die Funktion von AuaA als Prenyltransferase sollte bestätigt werden. Zusätzlich sollte das Enzym biochemisch untersucht werden. Folgende Arbeiten waren vorgesehen:

- Synthese von FPP und GPP als mögliche Prenyldonoren für Prenyltransferasen
- Klonierung von *auaA* aus der genomischen DNA von *S. aurantiaca* Sg a15
- Überproduktion von His₆-AuaA und Nachweis der Prenyltransferaseaktivität in der Membranfraktion von *E. coli*
- Biochemische Charakterisierung von AuaA
- Zielgerichtete Mutagenese ausgewählter Aminosäuren in den beiden aspartatreichen Motiven zur Untersuchung ihrer Bedeutung für die Prenylierungsreaktion

Zielgerichtete Mutagenese zur Untersuchung möglicher Aminosäurereste, welche die Bindung von DMAPP in pilzlichen Prenyltransferasen der DMATS-Familie vermitteln

In membrangebundenen Prenyltransferasen oder *trans*-Prenyltransferasen wird das allylische Substrat mittels Magnesium im aktiven Zentrum koordiniert. Die Enzymaktivität pilzlicher Prenyltransferasen der DMATS-Familie ist unabhängig von Metallionen. Deswegen sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die Bindung des Prenyldonors DMAPP in diesen Prenyltransferasen direkt mit Hilfe von positiv geladenen Aminosäureresten erfolgt. Folgende Arbeiten sollten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden:

- Bestimmung der zu mutierenden Aminosäurereste anhand von Sequenzvergleichen
- Einführung der gewünschten Mutationen mittels PCR

Zielgerichtete Mutagenese zur Unterstützung der Strukturaufklärung von FgaPT2

In Kooperation mit Prof. Heide und Prof. Stehle in Tübingen ist es gelungen, die Kristallstruktur von FgaPT2 aufzuklären. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die im aktiven Zentrum des Enzyms lokalisierten Aminosäurereste, welche eine zentrale Rolle in der Prenylierungsreaktion spielen ausgetauscht werden, um ihre Bedeutung für den

Reaktionsmechanismus zu demonstrieren. Dafür sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Einführung der gewünschten Mutationen mittels PCR
- Überproduktion der mutierten Proteine in *E. coli*
- Reinigung der mutierten Proteine und Bestimmung ihrer Aktivität

Synthese diprenylierter Indolderivate mit Hilfe der Prenyltransferasen FgaPT2 und 7-DMATS

Frau Dr. Steffan und Frau Dr. Kremer konnten im Rahmen ihrer Dissertationen zeigen, dass sowohl FgaPT2 als auch 7-DMATS gut geeignet sind zur chemoenzymatischen Synthese einfach prenylierter Tryptophanderivate. Durch den Einsatz beider Enzyme sollten im Rahmen dieser Dissertation Tryptophanderivate hergestellt werden, welche zwei Prenylreste tragen. Dafür sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Optimierung der Assaybedingungen im Hinblick auf die Ausbeute an diprenylierten enzymatischen Produkten
- Untersuchung der Substratspezifität von FgaPT2 und 7-DMATS gegenüber einfach prenylierten Tryptophanderivaten
- Analyse der Strukturen diprenylierter Produkte mittels LC-MS

Zielgerichtete Mutagenese von FgaPT2 und 7-DMATS zur Änderung ihrer Regiospezifität

Basierend auf den Informationen aus der Kristallstruktur von FgaPT2 hatte der letzte Teil meiner Arbeit zum Ziel, die Regiospezifität von FgaPT2 und 7-DMATS mit Hilfe zielgerichteter Mutagenese zu ändern. Folgende Arbeiten sollten dabei durchgeführt werden:

- Einführung der gewünschten Mutationen mittels PCR
- Produktion der mutierten Proteine in *E. coli*
- Reinigung der mutierten Proteine und Bestimmung der Enzymaktivität
- Analyse der gebildeten enzymatischen Produkte in Bezug auf die Position der Prenylgruppe

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Säulenmaterial und Enzyme

2.1.1 Chemikalien

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Chemikalien der Firmen Fluka, Merck, Roth, Sigma-Aldrich und VWR verwendet.

Tabelle 2-1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile.

Chemikalie	Hersteller
L-Abrin	Aldrich, Taufkirchen
Acetonitril, HPLC	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	BD, Heidelberg
Agarose	Roth, Karlsruhe
NZ-Amin (Caseinhydrolysat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
6-Aminohexansäure	Roth, Karlsruhe
Ammoniumbicarbonat	Fluka, Taufkirchen
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Apigenin	Alfa Aesar, Karlsruhe
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid (X-Gal)	Fermentas, St. Leon-Rot
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
2-Carboxylsäure-4-Hydroxychinolin	Acros Organics
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau G 250	Roth, Karlsruhe
2,4-Dihydroxychinolin	Alfa Aesar, Karlsruhe
2,4-Dimethylchinolin	Alfa Aesar, Karlsruhe
2,6-Dimethyl-4-Hydroxychinolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumdihydrogendiphosphat	VWR, Darmstadt
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DMAPP	aus Synthese im Arbeitskreis Li
Ethylacetat	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
FPP	eigene Arbeit
Genistein	TCI Europe, Eschborn
D-Glucose	Caleo, Bonn
Glycerin	Roth, Karlsruhe
GPP	eigene Arbeit
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
L- β -Homotryptophan	Fluka, Taufkirchen
4-Hydroxychinolin	Alfa Aesar, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
5-Hydroxychinolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4-Hydroxy-7-Chlorochinolin	Alfa Aesar, Karlsruhe
4-Hydroxy-8-Fluorochinolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-Hydroxyisochinolin	Alfa Aesar, Karlsruhe
2-Hydroxy-4-Methylchinolin	Alfa Aesar, Karlsruhe
4-Hydroxypyridin	Alfa Aesar, Karlsruhe
Imidazol	AppliChem, Darmstadt
Indol-3-DL-Milchsäure	Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl- β -Thiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
N-Laurylsarcosin	Novagen,
Luteolin	Alfa Aesar, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol, HPLC	Roth, Karlsruhe
5-Methoxy-DL-Tryptophan	Fluka, Taufkirchen
2-Methyl-4-Aminochinolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Methylchinolin	Alfa Aesar, Karlsruhe
2-Methyl-4-Chlorochinolin	Alfa Aesar, Karlsruhe
6-Methyl-Chromanon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Methyl-4-Hydroxychinolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Methyl-8-Hydroxychinolin	Acros Organics, Geel
4-Methyl-DL-Tryptophan	Bachem, Weil am Rhein
5-Methyl-DL-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
6-Methyl-DL-Tryptophan	Fluka, Taufkirchen
7-Methyl-DL-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
11-Methyl-DL-Tryptophan	Bachem, Weil am Rhein
1-Methyl-L-Tryptophan	Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Naringenin	Alfa Aesar, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
Phloretin	Roth, Karlsruhe
Phosphorpentoxid	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween® 20)	Roth, Karlsruhe
Quercetin	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt
Rotiporese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Rotiporese®Gel 30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Tetrabutylammoniumhydroxid-30-Hydrat	Fluka, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Roth, Karlsruhe
4-Thio-7-Trifluoromethylchinolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>trans-trans</i> -Farnesylchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>trans-trans</i> -Geranylchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trifluoroessigsäure (TFA)	Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
2-Trifluoromethyl-4-Hydroxychinolin	Alfa Aesar, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-Aminoethan (TRIS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Triton X-114	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tryptamin	Fluka, Taufkirchen
Trypton	AppliChem, Darmstadt
D-Tryptophan	Fluka, Taufkirchen
L-Tryptophan	Roth, Karlsruhe

2.1.2 Säulenmaterial

Säulenmaterialien wurden als Trockensubstanzen oder als Fertigsäulen vom Hersteller bezogen. Die Lagerung der Materialien erfolgte nach Herstelleranweisung.

Tabelle 2-2: Chromatographiematerial.

Chromatographiematerial	Hersteller
DOWEX AG 50W-X8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 4 mm)	C&S Chromatographie Service, Düren
Multospher 120 RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 x 10 mm)	C&S Chromatographie Service, Düren
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden

2.1.3 Enzyme und Kits

Tabelle 2-3: Enzyme, Antikörper, Größenstandards und Kits.

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Maus-IgG Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Change® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Waldbronn
Expand™ High Fidelity PCR System	Roche Applied Science, Mannheim
Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis	GE-Healthcare, Freiburg
Lysozym (76000 U/mg)	Fluka, Ulm
Monoklonaler Maus Anti-His-tag Antikörper	Calbiochem, Darmstadt
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
pGEM®-T easy Vector system	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Qiagen, Hilden
T4-DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Mannheim

2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Primer

Die für diese Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und Primer sind in folgenden Tabellen aufgeführt.

2.2.1 Bakterienstämme

Tabelle 2-4: Übersicht über verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacqZΔM15 Tn10</i> (TetR)]	Stratagene, Waldbronn
<i>E. coli</i> XL1 blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB+ lacqZΔM15 Tn10</i> (TetR)]	Stratagene, Waldbronn
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F- <i>ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR)	Novagen, Darmstadt
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	<i>nal-S, strS, rifS, thi-, lac-, ara+, gal+, mtl- ,F , recA+, uvr+, lon+</i>	Qiagen, Hilden

2.2.2 Plasmide

Tabelle 2-5: Kommerziell erworbene Klonierungs- und Expressionsvektoren.

Plasmid	Beschreibung	Hersteller
pGEM [®] -T easy	Linearisierter Vektor mit T-Überhang zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang	Promega, Mannheim
pQE60	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , AmpR, T5-Promotor	Qiagen, Hilden

Tabelle 2-6: Verwendete Plasmide und gDNA.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pIU18	Expressionskonstrukt von <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> für <i>E. coli</i> , basierend auf pHis8	(Steffan <i>et al.</i> , 2007)
pAG12	Expressionskonstrukt von <i>ftmPT1</i> aus <i>A. fumigatus</i> für <i>E. coli</i> , basierend auf pQE70	(Grundmann & Li, 2005)
pLW40	Expressionskonstrukt von <i>7-dmats</i> aus <i>A. fumigatus</i> für <i>E. coli</i> , basierend auf pQE70	(Kremer <i>et al.</i> , 2007)
gDNA	<i>S. aurantiaca</i> Sga15	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. R. Müller aus Saarbrücken

Tabelle 2-7: Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind.

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pES1	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_K187E</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_K178fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES2	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_R257G</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_R257fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES3	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_K259E</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_K259fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES4	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_D249H</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_D249fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES5	Expressionskonstrukt für <i>ftmPT1_K201E</i> , erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer FtmPT1_K201fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES6	Expressionskonstrukt für <i>ftmPT1_R292G</i> , erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer FtmPT1_R292fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES7	Expressionskonstrukt für <i>ftmPT1_K294E</i> , erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer FtmPT1_K294fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES8	Expressionskonstrukt für <i>ftmPT1_D284H</i> , erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer FtmPT1_D284fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES9	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_K239E</i> , erhalten durch Mutagenese von pLW40 (Primer 7-DMATS_K239fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES10	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_R311G</i> , erhalten durch Mutagenese von pLW40 (Primer 7-DMATS_R311fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES11	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_K313E</i> , erhalten durch Mutagenese von pLW40 (Primer 7-DMATS_K23313fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES12	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_D303H</i> , erhalten durch Mutagenese von pLW40 (Primer 7-DMATS_D303fw und rev)	(Stec <i>et al.</i> , 2008)
pES17	Klonierungskonstrukt für <i>auaA</i> , PCR amplifiziertes Fragment (991 bp, <i>NcoI</i> - <i>BglII</i> , Primer: <i>auaA NcoI</i> und <i>auaA BglII</i>) in pGEM [®] -T easy	(Stec <i>et al.</i> , 2011)
pES19	Expressionskonstrukt für <i>auaA</i> , <i>NcoI</i> - <i>BglII</i> Fragment (981 bp) aus pES14 kloniert in pQE60	(Stec <i>et al.</i> , 2011)
pES20	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_E89A</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_E89Afw und rev)	(Metzger <i>et al.</i> , 2009)
pES21	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_R100D</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_R100DAfw und rev)	(Metzger <i>et al.</i> , 2009)
pES22	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_R100Q</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_R100Qfw und rev)	(Metzger <i>et al.</i> , 2009)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pES23	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_K174E</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_K174Efw und rev)	(Metzger <i>et al.</i> , 2009)
pES24	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_K174Q</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_K174Qfw und rev)	(Metzger <i>et al.</i> , 2009)
pES25	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_I80F</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_I80FAfw und rev)	
pES26	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_K174F</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_K174Ffw und rev)	
pES27	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_R244E</i> , erhalten durch Mutagenese von pIU18 (Primer FgaPT2_R244E 2fw und rev)	
pES30	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_F129I</i> , erhalten durch Mutagenese von pLW40 (Primer 7-DMATS_F129I 2fw und rev)	
pES31	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_F226K</i> , erhalten durch Mutagenese von pLW40 (Primer 7-DMATS_F226K 2fw und rev)	
pES32	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_E298R</i> , erhalten durch Mutagenese von pLW40 (Primer 7-DMATS_E298R 2fw und rev)	
pES33	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_I80F_K174F</i> , erhalten durch Mutagenese von pES25 (Primer FgaPT2_K174Ffw und rev)	
pES34	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_K174F_R244E</i> , erhalten durch Mutagenese von pES26 (Primer FgaPT2_R244Efw und rev)	
pES35	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_I80F_R244E</i> , erhalten durch Mutagenese von pES25 (Primer FgaPT2_R244Efw und rev)	
pES36	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_F129I_F226K</i> , erhalten durch Mutagenese von pES30 (Primer 7-DMATS_F226Kfw und rev)	
pES37	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_F226K_E298R</i> , erhalten durch Mutagenese von pES31 (Primer 7-DMATS_E298Rfw und rev)	
pES38	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_F129I_E298R</i> , erhalten durch Mutagenese von pES32 (Primer 7-DMATS_F129Ifw und rev)	
pES39	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2_I80F_K174F_R244E</i> , erhalten durch Mutagenese von pES34 (Primer FgaPT2_K174Ffw und rev)	
pES40	Expressionskonstrukt für <i>7-DMATS_F129I_F226K_E298R</i> , erhalten durch Mutagenese von pES36 (Primer 7-DMATS_E298Rfw und rev)	
pES44	Expressionskonstrukt für <i>auaA_N52D</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: N52D fw und rev)	(Stec & Li, 2012)
pES45	Expressionskonstrukt für <i>auaA_N52A</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: N52A fw und rev)	(Stec & Li, 2012)

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pES46	Expressionskonstrukt für <i>auaA_R53A</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: R53A fw und rev)	(Stec & Li, 2012)
pES47	Expressionskonstrukt für <i>auaA_D56N</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: D56N fw und rev)	(Stec & Li, 2012)
pES48	Expressionskonstrukt für <i>auaA_D56A</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: D56A fw und rev)	(Stec & Li, 2012)
pES49	Expressionskonstrukt für <i>auaA_D60N</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: D60N fw und rev)	(Stec & Li, 2012)
pES50	Expressionskonstrukt für <i>auaA_D60A</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: D60A fw und rev)	(Stec & Li, 2012)
pES51	Expressionskonstrukt für <i>auaA_D180N</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: D180N fw und rev)	(Stec & Li, 2012)
pES52	Expressionskonstrukt für <i>auaA_D180A</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: D180A fw und rev)	(Stec & Li, 2012)
pES53	Expressionskonstrukt für <i>auaA_D184N</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: D184N fw und rev)	(Stec & Li, 2012)
pES54	Expressionskonstrukt für <i>auaA_D184A</i> , erhalten durch Mutagenese von pES19 (Primer: D184A fw und rev)	(Stec & Li, 2012)

2.2.3 Primer

Tabelle 2-8: Oligonukleotide, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Rote Buchstaben entsprechen veränderten Basen, unterstrichene Basen markieren Restriktionsschnittstellen.

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid
FgaPT2_K187fw	ATGGCCGCTTTGCACTT G AGACGTACATATACCCG	pES1
FgaPT2_K187rev	CGGGTATATGTACGTCT CA AGTGCAAAGCGGCCAT	
FgaPT2_R257fw	CAGTCCTGCCAAGTCG G GAATCAAGATCTACCTGC	pES2
FgaPT2_R257rev	GCAGGTAGATCTTGATT C CGACTTGGCAGGACTG	
FgaPT2_K259fw	TGCCAAGTCGAGAATC G AGATCTACCTGCTGGAGC	pES3
FgaPT2_K259rev	GCTCCAGCAGGTAGATCT C GATTCTCGACTTGGCA	
FgaPT2_D249fw	GCCTAGTGTCTGT C ATCTGACCAGTCCTGCCAAG	pES4
FgaPT2_D249rev	CTTGGCAGGACTGGTCAGAT G ACAGGACACTAGGC	
FtmPT1_K201fw	GGGACCGTCCTGGT C GAGGCGTATTTCTACC	pES5
FtmPT1_K201rev	GGTAGAAATACGCCT C GACCAGGACGGTCCC	
FtmPT1_R292fw	GAACCCGGCAAATCG G GGGTGAAGTTCTACGC	pES6
FtmPT1_R292rev	GCGTAGAACTTCACCC C GATTGCGGGGTTTC	
FtmPT1_K294fw	CGGCAAATCGCGGGTG G AGTTCTACGCCAGCGAG	pES7
FtmPT1_K294rev	CTCGCTGGCGTAGAACT C CACCCGCGATTGCGG	
FtmPT1_D284fw	CATTCCTGTCCACC C ACCTCGTCGAACCCGGC	pES8
FtmPT1_D284rev	GCCGGGTTTCGACGAGGT G GGTGGACAGGAAATG	
7-DMATS_K239fw	CGGGTCGTGTCACCACA G AGGCGTACTTTTTCCCG	pES9
7-DMATS_K239rev	CGGGAAAAAGTACGCCT C TGTGGTGACACGACCCG	
7-DMATS_R311fw	TGAACGAGGCAGACTCT G GGATCAAGATATACGTG	pES10
7-DMATS_R311rev	CACGTATATCTTGATCC C AGAGTCTGCCTCGTTCA	
7-DMATS_K313fw	GGCAGACTCTCGGATC G AGATATACGTGCGGATGC	pES11
7-DMATS_K313rev	GCATCCGCACGTATATCT C GATCCGAGAGTCTGCC	
7-DMATS_D303fw	GAGATGATCAGCGTC C ATTGCGTGAACGAGGCAGAC	pES12
7-DMATS_D303rev	GTCTGCCTCGTTACGCAAT G GACGCTGATCATCTC	
AuaA NcoI	TT CCATG <u>G</u> CGCTGCTTCAAGTCGGCAG	pES17
AuaA BglII	CAG AGATC <u>T</u> CGAGGCGACGAAGACCCGCGAGAGGATCCG	
FgaPT2 E89Afw	GATACGGCACTCCGTT C GATTGAGCCTAAATTGC	pES20
FgaPT2 E89Arev	GCAATTTAGGCTCAAT G CGAACGGAGTGCCGTATC	
FgaPT2 R100Dfw	GCTCTAATTCAATAGTG GATT ACACATTGAGCCGATC	pES21
FgaPT2 R100Drev	GATCGGCTCGAATGTGT AATC ACTATTGAATTAGAGC	
FgaPT2 R100Qfw	GCTCTAATTCAATAGTG CA ATACACATTGAGCCGATC	pES22
FgaPT2 R100Qrev	GATCGGCTCGAATGTGT ATG CACTATTGAATTAGAGC	
FgaPT2 K174Efw	CTATCAGGACGCAGAAC G AGCTCGCGCTCGATC	pES23
FgaPT2 K174Erev	GATCGAGCGCGAGCT C GTTCTGCGTCCTGATAG	
FgaPT2 K174Qfw	CTATCAGGACGCAGAAC C AGCTCGCGCTCGATC	pES24
FgaPT2 K174Qrev	GATCGAGCGCGAGCT G GTTCTGCGTCCTGATAG	

Primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid
FgaPT2 I80Ffw	CCCGCTGGTTGAGCTTCCTCACTCGATACGGC	pES25
FgaPT2 I80Frev	GCCGTATCGAGTGAGGAAGCTCAACCAGCGGG	
FgaPT2 K174Ffw	CTATCAGGACGCAGAAC TTCCTCGCGCTCGATCTG	pES26
FgaPT2 K174Frev	CAGATCGAGCGCGAGGAA GTTCTGCGTCCTGATAG	
FgaPT2 R244E 2fw	GCCAGTCCC GAGCTAGTGTCTGTGATCTGACCAGTCC	pES27
FgaPT2 R244E 2rev	GGACACTAG CTCGGGACTGGCAGTGCTCTTGGAACCGC	
7DMATS F129I 2fw	GAGGTCC ATCCTGACAGACGACTTCACTCCGCT	pES30
7DMATS F129I 2rev	GTCGTCTGT CAGGATGGACCTCCACGGCGCGTTACTC	
7DMATS F226K 2fw	CACAGAGT AAGCTGGCGTTTCGACCTGGACGCGGGTCG	pES31
7DMATS F226K 2rev	CGAACGCCAG CTTACTCTGTGTGGTATGCTCGCCTTCTGG	
7DMATS E298R 2fw	CAAAGACG CGGATGATCAGCGTCGATTGCGTGAAC	pES32
7DMATS E298R 2rev	GATCATC CGCGTCTTTGCCGCGCCACCGTAGCTAC	
N52Dfw	CGAATTGACC GATCGCTACGCCGATCGCATCGAAG	pES44
N52Drev	GTAGCGAT CGGTCAATTCGATGGCGAGGCACTTCACC	
N52Afw	CGAATTGACC GCTCGCTACGCCGATCGCATCGAAG	pES45
N52Arev	GTAGCGA GCGGTCAATTCGATGGCGAGGCACTTC	
R53Afw	GACCAAT GCCTACGCCGATCGCATCGAAGACGCG	pES46
R53Arev	GCGTAG GCAATTGGTCAATTCGATGGCGAGGCAC	
D56Nfw	CTACGCC ATCGCATCGAAGACGCGGTGAATCG	pES47
D56Nrev	GATGCGAT TGGCGTAGCGATTGGTCAATTCGATG	
D56Afw	CTACGCC GCTCGCATCGAAGACGCGGTGAATCG	pES48
D56Arev	GATGCGA GCGGCGTAGCGATTGGTCAATTCGATG	
D60Nfw	CATCGAA ACGCGGTGAATCGCCAGGAGCGGAC	pES49
D60Nrev	CGCGT TTTTCGATGCGATCGGCGTAGCGATTGGTC	
D60Afw	CATCGAAG CGCGGTGAATCGCCAGGAGCGGAC	pES50
D60Arev	CACCGCG GCTTCGATGCGATCGGCGTAGCGATTG	
D180Nfw	CATCACC AACGTGGAGGGGGACGCGAAGCGCGG	pES51
D180Nrev	CTCCACGT TGGTGATGTCCTTGATGCCCCGACAGC	
D180Afw	CATCACC GCGGTGGAGGGGGACGCGAAGCGCGG	pES52
D180Arev	CTCCACG GCGGTGATGTCCTTGATGCCCCGACAGC	
D184Nfw	GGAGGGG AACGCGAAGCGCGGCTACCGGAGCTTC	pES53
D184Nrev	CTTCGCGT TCCCCTCCACGTCGGTGATGTCCTTC	
D184Afw	GGAGGGGG CGCGAAGCGCGGCTACCGGAGCTTC	pES54
D184Arev	GGAGGGGG CCGCGAAGCGCGGCTACCGGAGCTTC	

2.3 Nährmedien, Antibiotika und Lösungen

2.3.1 Nährmedien

Nachfolgend sind die verwendeten Nährlösungen aufgeführt. Sie wurden vor der Verwendung 20 min bei 121 °C und 2 bar sterilisiert. Zur Herstellung fester Medien wurden

der entsprechenden Nährlösung vor der Sterilisation 1.8 % (w/v) Agar zugegeben. Antibiotika und andere hitzelabile Zusätze wurden den Nährmedien nach der Sterilisation getrennt zugegeben.

2.3.1.1 Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook & Russell, 2001)

NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
Trypton	10 g
Wasser _{dem.}	ad 1000 ml

2.3.1.2 Terrific-Broth (TB)-Medium (Sambrook & Russell, 2001)

Hefeextrakt	24 g
Trypton	12 g
Glycerin	4 ml
Wasser _{dem.}	ad 900 ml

Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium 100 ml einer sterilen Lösung von 0.17 M KH_2PO_4 und 0.72 M K_2HPO_4 zugegeben.

2.3.1.3 NZY⁺-Medium

NZ Amin (Caseinhydrolysat)	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Wasser _{dem.}	ad 1000 ml

Vor der Sterilisation wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7.5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden dem Medium steril 20 ml 20 %iger Glucose-Lösung zugegeben sowie je 12.5 ml einer Lösung von 1 M MgCl_2 und 1 M MgSO_4 .

2.3.1.4 Medium zur Blau-Weiß-Selektion

LB-Medium (2.3.1.1) mit folgenden Zusätzen:

1 M IPTG	1,0 ml/l
4 % (w/v) X-Gal (in DMSO)	1,0 ml/l

2.3.2 Antibiotika

Konzentrierte Antibiotika-Stammlösungen (Tabelle 2-9) wurden steril filtriert und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Die Zugabe der Antibiotika zu den autoklavierten festen Nährmedien erfolgte nach Abkühlen auf ca. 50 °C oder zu den Flüssigmedien kurz vor Gebrauch.

Tabelle 2-9: Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Konzentration		Lösungsmittel
	Stammlösung [mg/ml]	Medium [µg/ml]	
Carbenicillin	50	50	H ₂ O
Chloramphenicol	25-50	25-50	Ethanol
Kanamycin	50	50	H ₂ O
Tetracyclin	12.5	12.5	Ethanol

2.3.3 Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Puffer mit bidestilliertem Wasser vorbereitet, autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.3.3.1 Puffer und Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA

Lösung 1	TrisHCl (pH 8.0)	50 mM
	Glucose	50 mM
	EDTA	25 mM
Lösung 2	NaOH	0.2 M
	SDS	1 % (v/w)
Lösung 3	Kaliumacetat (pH 5.2)	3 M

2.3.3.2 Puffer und Lösungen zur Gelelektrophorese

Agarosegelelektrophorese

50x TAE-Puffer	TrisHCl (pH 8.0)	2 M
	EDTA	0.05 M
	Natriumacetat	0.5 M
Ladepuffer	Glycerin	30 % (v/v)
	Bromphenolblau	0.25 % (w/v)
Sybr®Safe		5 ‰

SDS-PAGE

Laufpuffer	Tris-Base	0.025 M
	Glycin	1.92 M
	SDS	0.1 % (w/v)
Sammelgel (4 %)	TrisHCl (pH 6.8)	125 mM
	Rotiphorese® Gel 30	4 % (w/v)
	SDS	0.1 % (w/v)
	APS	0.1 % (w/v)
	TEMED	0.1 % (v/v)
	Wasser _{bidest}	ad 10 ml
Trenngel (12 %)	TrisHCl (pH 8.8)	375 mM
	Rotiphorese® Gel 30	12 % (w/v)
	SDS	0.1 % (w/v)
	APS	0.1 % (w/v)
	TEMED	0.1 % (v/v)
	Wasser _{bidest}	ad 10 ml
Probenpuffer	TrisHCl (pH 6.8)	65 mM
	Glycerin	25 % (w/v)
	SDS	2 % (w/v)
	Bromphenolblau	0.02 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	50 µl/ml
Fixierlösung	Ethanol	20 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Wasser _{bidest}	70 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blau- Lösung	Coomassie Brilliant Blau G-250	0.25 % (w/v)
	Methanol	45 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Wasser _{bidest}	45 % (v/v)
Entfärberlösung	Ethanol	45 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Wasser _{bidest}	45 % (v/v)

2.3.3.3 Puffer und Lösungen zur Proteinreinigung

Lysepuffer	NaCl	300 mM
	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM
	Imidazol	20 mM
		pH 8.0 einstellen
	Lysozym (frisch zugeben)	1 mg/ml
Waschpuffer	NaCl	300 mM
	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM
	Imidazol	50 mM
		pH 8.0 einstellen
Elutionspuffer	NaCl	300 mM
	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	50 mM
	Imidazol	350 mM
		pH 8.0 einstellen
Aufbewahrungs- puffer	TrisHCl (pH 7.5)	50 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
		pH 7.5 einstellen

Alle Puffer zur Proteinreinigung wurden bei 4 °C gelagert.

2.3.3.4 Puffer und Lösungen für Western Blot-Analyse

Anodenpuffer I	TrisHCl (pH 10.4)	300 mM
	Methanol	10 % (v/v)
Anodenpuffer II	TrisHCl (pH 10.4)	250 mM
	Methanol	10 % (v/v)
Kathoden-Puffer	TrisHCl (pH 9.4)	250 mM
	Aminohexansäure	40 mM
	Methanol	10 % (v/v)

PBST-Puffer	KCl	2.7 mM
	KH ₂ PO ₄	1.5 mM
	NaCl	137 mM
	Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
	Tween® 20	0.05 % (v/v)
Stripping-Puffer	TrisHCl (pH 6.7)	625 mM
	β-Mercaptoethanol	100 mM
	SDS	137 mM
Blockierlösung	Milchpulver in PBST-Puffer	5 % (w/v)
Farbreaktions- Puffer	TrisHCl (pH 8.8)	50 mM
	MgCl ₂	5 mM
Färbelösung	BCIP	0.3 mg/ml
	NBT	1.5 mg/ml
	in Farbreaktionspuffer	

2.3.3.5 Puffer und Lösungen zur Synthese von GPP und FPP

Ionenaustausch- Puffer	Ammoniumbicarbonat	25 mM
	in Isopropanol	2 % (v/v)
Extraktion- Puffer	Acetonitril	50 % (v/v)
	Isopropanol	50 % (v/v)

2.3.3.6 Sonstige Puffer und Lösungen

Bradford- Reagenz	Serva Blau G 250	70 mg/l
	Ethanol 96 %	50 ml/l
	Phosphorsäure 85 %	100 ml/l

2.4 Chemische Synthesen

2.4.1 Synthese von GPP

Die Synthese von GPP erfolgte nach dem von Woodside *et al.* (1988) beschriebenen Protokoll. Dabei wurde Geranylchlorid mit Tetrabutylammoniumhydrogendiphosphat diphosphoryliert. Da das Phosphorylierungsmittel nicht käuflich erwerblich ist, wurde es zuvor synthetisch hergestellt.

2.4.1.1 Synthese von Tetrabutylammoniumhydrogendiphosphat

Eine Glassäule (3.5 x 35 cm) wurde mit ca. 400 ml DOWEX AG 50W-X8 Harz in bidest. Wasser (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, H⁺-Form) befüllt. Anschließend wurden 6.26 g (28 mmol) Dinatriumdihydrogendiphosphat in 1 % Ammoniaklösung gelöst und auf das Säulenmaterial geladen. Die ersten 50 ml Durchfluss wurden verworfen, bis sich die gesamte Lösung im Säulenmaterial befand. Danach wurde ein Volumen von 300 ml mit bidest. Wasser in einen Rundkolben eluiert. Der pH-Wert des Eluates wurde mit 38.3 g Tetrabutylammoniumhydroxid (Aldrich, Taufkirchen) auf 7.3 eingestellt, die Lösung in einem Isopropanol-Trockeneisbad eingefroren und über Nacht bei -80 °C gelagert. Die gefrorene Lösung wurde anschließend lyophilisiert und das resultierende weiße Pulver für den zweiten Schritt der Synthese verwendet.

2.4.1.2 Phosphorylierung von Geranylchlorid

Um das Geranylchlorid zu phosphorylieren, wurden 18.28 g (9.3 mmol) des zuvor synthetisierten Tetrabutylammoniumhydrogendiphosphats (2.4.1.1) in 40 ml wasserfreiem Acetonitril (zuvor mittels Molekularsieb getrocknet) in einem trockenen Rundkolben gelöst. Nach Zugabe von 1.66 g (9.6 mmol) Geranylchlorid wurde das Gemisch 5 min mit Stickstoff gespült und anschließend 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* bei 30 °C eingeeengt, bis ein öliges, hellgelbes Rückstand sichtbar war. Dieser wurde in 6 ml Ionenaustauschpuffer (2.3.3.5) gelöst und auf ca. 400 ml DOWEX AG 50W-X8 Harz (NH⁴⁺-Form, pH 7.0) gegeben, welches zuvor mit Ionenaustauschpuffer äquilibriert wurde. Die Elution erfolgte mit Ionenaustauschpuffer (2-faches Säulenvolumen). Das Eluat wurde in einem Trockeneis/Isopropanolbad eingefroren und anschließend lyophilisiert.

2.4.1.3 GPP-Reinigung

Um Phosphate und Pyrophosphate abzutrennen, welche enzymatische Reaktionen hemmen könnten, wurde die getrocknete Substanz zwischen Extraktionspuffer und Ammoniumbicarbonat-Lösung (0.05 mM) ausgeschüttelt. Dazu wurde die Substanz zunächst in 10 ml

der Ammoniumbicarbonat-Lösung gelöst und mit 40 ml des Extraktionspuffers gut gemischt bis ein weißer Niederschlag sichtbar wurde. Dieser wurde durch Zentrifugation entfernt und die obere Phase in einen Rundkolben überführt. Der Niederschlag wurde anschließend in 4 ml der Ammoniumbicarbonat-Lösung gelöst und mit 16 ml des Extraktionspuffers ausgeschüttelt. Wieder wurde der klare Überstand in den Rundkolben überführt. Es folgten zwei weitere Extraktionsschritte, wobei das Pellet jedes Mal in 4 ml Ammoniumbicarbonat-Lösung gelöst und mit 16 ml des Extraktionspuffers ausgeschüttelt wurde. Die Überstände wurden vereinigt und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers in einem Wasserbad bei 30 °C auf ein Volumen von ca. 20 ml eingengt und anschließend lyophilisiert.

2.4.2 Synthese von FPP

Die Synthese von FPP erfolgte mit dem zu phosphorylierenden Edukt Farnesylchlorid (2.32 g, 9.6 mmol) analog zu der von GPP (2.4.1).

2.5 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen erfolgte in der Regel unter Selektionsdruck in LB-Flüssigmedium (2.3.1.1) im Schüttelinkubator (Ecotron, Firma Infors AG, Bottmingen) bei 180 rpm oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C. Als Inokulum für Hauptkulturen dienten 1-2 % (v/v) einer entsprechenden Übernachtskultur.

Zur Stammkonservierung wurden Zellen von *E. coli* über Nacht in LB-Medium bei 37 °C kultiviert, aliquotiert und mit sterilem Glycerin versetzt (Endkonzentration 20 % (v/v)).

Zur Reaktivierung eines konservierten Stammes wurde ein Aliquot der Glycerin-Suspension auf einer LB-Agarplatte (gegebenenfalls mit Antibiotikum) ausgestrichen.

2.6 Methoden der Molekularbiologie

2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979)

Plasmidtragende *E. coli*-Stämme wurden in 5 ml LB-Medium unter Selektionsdruck bei 37 °C über Nacht kultiviert. 2 ml Bakterienkultur wurden 1 min bei 13000 x g zentrifugiert (Fresco 17 Zentrifuge, Firma Heraeus, Hanau) und das Pellet anschließend in 200 µl Lösung 1 (2.3.3.1) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 400 µl Lösung 2. Nach 5 min Inkubation zeigte die Klärung der Lösung die Lyse der Zellen an. Durch Zugabe von 300 µl Lösung 3 wurden chromosomale DNA und Proteine gefällt und

nach 5 min Inkubation auf Eis zusammen mit Zelltrümmern durch Zentrifugation bei 13000 x g für 15 min sedimentiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol gefällt. Das DNA-Pellet wurde nach dem Trocknen in 25 µl bidest. Wasser resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.6.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit NucleoSpin®Plasmid Kit

Um Plasmid-DNA von hoher Reinheit zu gewinnen wurde das NucleoSpin®Plasmid Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte bei Raumtemperatur gemäß beiliegender Hersteller-Anleitung.

2-6 ml Bakterienkultur wurden 30 s bei 11000 x g zentrifugiert (Fresco 17 Zentrifuge, Firma Heraeus, Hanau) und das Pellet in 250 µl Puffer A1 resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 250 µl Puffer A2 zu der Suspension gegeben und das Gemisch bis zur Klärung des Lysates inkubiert (max. 5 min). Nach Zugabe von 300 µl Puffer A3 erfolgte eine Zentrifugation bei 11000 x g für 5 min und der daraus resultierende klare Überstand wurde auf eine NucleoSpin®Plasmid-Säule geladen und 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die an die Silicamembran gebundene Plasmid-DNA nacheinander mit 500 µl Puffer AW und 600 µl Puffer A4 gewaschen, wobei der jeweilige Puffer durch Zentrifugation für 1 min bei 11000 x g entfernt wurde. Nach Trocknung der Silicamembran durch eine weitere Zentrifugation für 2 min bei 11000 x g wurde die Plasmid-DNA mit 30 µl bidest. Wasser in ein sauberes Reaktionsgefäß eluiert und bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Reinigung und Konzentrierung von DNA

2.6.2.1 Alkohol-Fällung

Die Fällung mit Alkohol ist eine gebräuchliche Methode zur Konzentrierung und gleichzeitiger Reinigung der DNA von wasserlöslichen, niedermolekularen Substanzen.

Ethanol-Präzipitation

Zur DNA-Lösung wurde 2.5-faches Volumen an eiskaltem absoluten Ethanol zugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min auf Eis bildete sich ein weißer Niederschlag, der durch Zentrifugation bei 13000 x g (Fresco 17 Zentrifuge, Firma Heraeus, Hanau) für 30 min pelletiert wurde. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol (-25 °C) gewaschen, getrocknet und in bidest. Wasser resuspendiert.

Isopropanol-Präzipitation

Die DNA-Lösung wurde mit reinem, eiskaltem Isopropanol (0.8 Vol.) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem für Ethanol-Präzipitation.

2.6.3 Bestimmung von DNA-Konzentration

Die Quantifizierung von DNA wurde anhand der Fluoreszenz der Proben im mit Sybr®Safe gefärbten Agarosegel vorgenommen. Dabei erfolgte ein Vergleich der Bandenintensität nach Auftrennung durch eine Agarosegelelektrophorese (2.3.3.2, 2.6.4) mit einem DNA-Größenstandard mit bekannter Konzentration.

2.6.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese von DNA erfolgte in horizontalen Flachbettapparaturen. Zur routinemäßigen Analyse von DNA-Proben wurden Agarosegele mit 0.8 % Agarose in TAE-Puffer (2.3.3.2) verwendet. Nach Erstarren der geschmolzenen Agarose wurde der Gelkamm entfernt und das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Nachdem die DNA-Proben mit Ladepuffer im Verhältnis 3:1 versetzt wurden, erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente bei einer Gelgröße von 255 cm² für 40-60 min bei 90-120 V. Zur Detektion der DNA unter UV-Licht bei 365 nm wurde ein ImageQuant 100 System (GE Healthcare, Freiburg) verwendet.

2.6.5 DNA-Manipulation

2.6.5.1 Restriktion der DNA durch Endonukleasen

Restriktionen zu analytischen Zwecken wurden in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Dabei wurden zu der in bidest. Wasser gelösten DNA entsprechende Endonucleasen sowie geeignete Puffer zugegeben und die Reaktionsgemische wurden unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen inkubiert. Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden Restriktionen in einem Maßstab von 100 µl durchgeführt.

2.6.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden durch Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h oder bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Für eine erfolgreiche Ligation waren bestimmte Minimalkonzentrationen sowie ein geeignetes Verhältnis der zu ligierenden DNA-Fragmente eine wichtige Voraussetzung. Entsprechend der Formel 1 wurden die beiden Komponenten in einem molaren Verhältnis von 5:1 eingesetzt.

Formel 1: Formel zur Berechnung des Massenverhältnisses

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \frac{5 \times \text{Masse Vektor} [\text{ng}] \times \text{Größe Insert} [\text{bp}]}{\text{Größe Vektor} [\text{bp}]}$$

Die Ligationsansätze wurden i.d.R. in einem Gesamtvolumen von 10 µl vorbereitet, wobei sie Ligationspuffer mit ATP sowie 1 U T4-DNA-Ligase enthielten. Die Ligation eines Inserts in den pGEM[®]-T easy Vektor erfolgte nach Herstelleranweisung. Ein Reaktionsgemisch (10 µl) enthielt 50 ng Vektor, 3 U T4-DNA-Ligase, sowie einfach konzentrierten „Rapid Ligation“-Puffer. Nach der Zugabe von ca. 250 ng Insert zu dem Gemisch erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ligationsansatz zur Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet.

2.6.6 DNA-Transformation

Der Transfer von DNA in *E. coli* erfolgte über Transformation in zuvor hergestellte Ca²⁺-kompetente Zellen.

2.6.6.1 Herstellung und Konservierung dauerhaft Ca²⁺-kompetenter Zellen

1 ml einer Übernachtskultur einer *E. coli*-Einzelkolonie diente zur Inokulation von 100 ml LB-Medium, welches nach Bedarf mit entsprechendem Antibiotikum supplementiert wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 kultiviert und nach einer Inkubation für 15 min auf Eis durch Zentrifugation bei 3000 x g für 10 min (Multifuge 1 L-R, Firma Heraeus, Hanau) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 30 ml eiskalter, steriler 0.1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut für 10 min bei 3000 x g zentrifugiert. Nach einem weiteren Resuspendieren der Zellen und einer Inkubation für 20 min auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die pelletierten Zellen wurden in 3 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen und in 200 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.6.6.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Je 200 µl kompetente *E. coli*-Zellen (2.6.6.1) wurden mit 0.1-1.0 ng zu transformierender DNA gut durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der DNA wurden die Zellen für 90 sec auf 42 °C erwärmt. Anschließend wurde der Transformationsansatz kurz auf Eis abgekühlt, bevor 600 µl LB-Medium zugegeben wurden. Zur Regeneration der Zellen nach dem Hitzeschock und zur Ausprägung der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenzen erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 60 min. Je 200 µl Aliquots wurden auf LB-Agar mit

entsprechenden Antibiotika ausplattiert und zur Isolierung rekombinanter Klone über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.6.6.3 Blau-Weiß-Selektion

Bei der Klonierung von DNA-Fragmenten in den Vektor pGEM[®]-T easy, der über das *lacZ*-Operon verfügt, wurde die Blau/Weiß-Selektion zur Identifizierung rekombinanter Plasmide angewendet. Die Methode beruht auf einer *in vivo*-Aktivitätsmessung des Enzyms β -Galactosidase. Einige *E. coli*-Stämme, wie z.B. XL1-Blue sind infolge einer Mutation im *lacZ*-Gen nicht in der Lage, eine funktionelle β -Galactosidase zu bilden. Durch sogenannte α -Komplementation mit dem Klonierungsvektor pGEM[®]-T easy, welcher das Gen für das α -Kette der β -Galactosidase enthält, kann der Stamm jedoch das funktionelle Enzym synthetisieren. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors liegt innerhalb des Gens, das für das α -Kette codiert. Durch Insertion eines Gens in die MCS wird das Strukturgren unterbrochen und somit die Komplementation verhindert. Die Selektion von Transformanten mit rekombinantem Plasmid erfolgt über Farbreaktion. Dazu wird dem verwendeten Selektionsmedium neben einem Antibiotikum auch das Substrat der β -Galactosidase, X-Gal, zugesetzt. Wird diese farblose Substanz durch die funktionelle β -Galactosidase gespalten, entsteht durch Autooxidation der blaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo und die Kolonien der Transformanten ohne rekombinantes Plasmid erscheinen blau. Transformanten mit einem inserierten Gen können die α -Kette der β -Galactosidase nicht mit Hilfe des Plasmids komplementieren und erscheinen weiß. Die Transkription der *lac*-Gene und des inserierten Zielgens unterliegt der Kontrolle des *lac*-Promotors, daher wird dem Medium zur Expression dieser Gene zusätzlich das nicht abbaubare Substratanalogon IPTG zugesetzt.

2.6.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten sowie zur Einführung von Mutationen bei zielgerichteter Mutagenese eingesetzt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem BioRad MJ Mini Cycler (BioRad, München) durchgeführt.

2.6.7.1 PCR zur Klonierung von *auaA*

Die Amplifikation von *auaA* aus gDNA von *S. aurantiaca* Sg a15 erfolgte mit dem *Expand[™] High Fidelity PCR-System* (Roche, Schweiz) unter Verwendung der Primer *auaA* NcoI und *auaA* BglII (Tabelle 2-8). Die Bedingungen sind in Tabelle 2-10 aufgeführt.

Tabelle 2-10: Bedingungen für die PCR zur Amplifikation von *auaA* aus gDNA von *S. aurantiaca* Sg a15.

Komponente	Endkonzentration	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
<i>template</i>	ca. 10 ng gDNA	initiale Denaturierung	94 °C	4 min	1
Primer	je 10 pmol	Denaturierung	94 °C	1 min	} 25
dNTPs	je 0.2 mM	Annealing	64.9 °C	45 s	
PCR-Puffer (10x)	1x	Elongation	72 °C	90 s	
Polymerase	2.5 U	finale Elongation	72 °C	7 min	1
Endvolumen	50 µl	Ende	4 °C	∞	1

2.6.7.2 PCR zur zielgerichteten Mutagenese

Im Elongationsschritt einer PCR ist es möglich, eine oder mehrere spezifische Mutationen einzufügen. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Methoden angewendet. Zum einen erfolgte die Einführung der Mutationen nach der QuikChange™ Methode (Stratagene, Waldbronn) und zum anderen wurde einfache PCR unter Verwendung des *Expand™ High Fidelity PCR-Systems* durchgeführt (Zheng *et al.*, 2004).

Zielgerichtete Mutagenese nach der QuikChange™ Methode

Das Einführen von Mutationen mit der QuikChange™ Methode erfolgte in drei Schritten und basierte auf der Verlängerung von zwei komplementären mutagenen Primern (2.2.3) durch die *PfuTurbo* DNA-Polymerase. Nach Anweisung des Herstellers hatten die zueinander komplementären Primer eine Länge von 33-36 bp und ihre Schmelztemperatur lag über 78 °C. Die Primersequenzen enthielten an beiden Enden mindestens ein Guanin oder Cytosin und die gewünschte Mutation genau in der Mitte. Als *template* wurde ein *dam*-methyliertes Expressionskonstrukt mit dem zu mutierenden Insert verwendet, das zuvor aus einem Bakterienstamm mit intaktem Methylierungssystem isoliert wurde. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2-11 zusammengefasst. Im Anschluss an die PCR wurde die nicht-mutierte, methylierte *template*-DNA durch Zugabe von 20 U der Restriktionsendonuklease DpnI entfernt. Im letzten Schritt erfolgte die Transformation von 1 µl des Ansatzes in *E. coli*. Eine Sequenzierung (2.6.8) der isolierten Plasmide bestätigte die Mutationen.

Tabelle 2-11: PCR-Bedingungen für die zielgerichtete Mutagenese nach der QuikChange® Methode.

Komponente	Endkonzentration	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
<i>template</i>	10 ng	initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Primer	je 10 pmol	Denaturierung	95 °C	30 s	} 16
dNTPs	1 µl	Annealing	55 °C	60 s	
PCR-Puffer (10x)	1x	Elongation	68 °C	x min *	
Polymerase	2.5 U	finale Elongation	68 °C	7 min	1
Endvolumen	50 µl	Ende	4 °C	∞	1

*Die Elongationsdauer richtete sich nach der Größe des eingesetzten Expressionskonstruktes: pLU18: 7.5 min, pAG12 und pLW40: 5.5 min

Zielgerichtete Mutagenese nach der Methode von Zheng *et al.*, 2004

Für die Einführung von Mutationen nach der Methode von Zheng *et al.* wurde das *Expand High Fidelity PCR-System* verwendet. Anderes als bei der QuikChange™ Methode waren die Primer (Tabelle 2-8) nur am 5'-Ende komplementär zueinander und besaßen einen 3'-Überhang von mindestens 8 Basen. Die Primerlänge betrug 33-40 bp und die Schmelztemperatur lag zwischen 78.8 und 84 °C. Die gewünschte Mutation lag 6-8 bp entfernt von dem 5'-Ende der Primersequenz, welche an beiden Enden mindestens ein Guanin oder Cytosin enthielt. Die PCR wurde gemäß Tabelle 2-12 durchgeführt. Analog zu der QuikChange™ Methode schloss sich an die PCR ein Verdau der *template*-DNA mit DpnI, sowie die Transformation in *E. coli* an.

Tabelle 2-12: PCR-Bedingungen für die zielgerichtete Mutagenese nach Zheng *et al.*, 2004.

Komponente	Endkonzentration	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
<i>template</i>	15 ng	initiale Denaturierung	94 °C	3 min	1
Primer	je 30 pmol	Denaturierung	94 °C	60 s	} 16
dNTPs	je 0.2 mM	Annealing	55 °C	60 s	
PCR-Puffer (10x)	1x	Elongation	68 °C	x min *	
Polymerase	2.5 U	finale Elongation	68 °C	7 min	1
Endvolumen	50 µl	Ende	4 °C	∞	1

*Die Elongationsdauer richtete sich nach der Größe des eingesetzten Expressionskonstruktes: pLW40: 5.5 min und pES19: 5.0 min

2.6.8 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen

Sequenzierungen wurden von den Firmen Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) und GATC Biotech AG (Konstanz) mit Hilfe der Didesoxynucleotid-Kettenabbruch-Methode auf einem automatischen LI-COR Sequenzierer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch einen

Vergleich zwischen den ermittelten und erwarteten Sequenzen mit Hilfe des Programmes DNASIS 2.1 (Hitachi Software Engineering, San Bruno).

Zum Vergleich der Homologien auf DNA-Ebene wurde das Programm „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Homologien auf Aminosäure-Ebene wurden mittels EMBOSS Align (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss>) verglichen.

Multiple Sequenzvergleiche auf Aminosäure-Ebene wurden mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) und die Strukturvorhersage für AuaA mit SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) durchgeführt.

2.6.9 Heterologe Genexpression

2.6.9.1 Expression von *auaA* und mutierten Derivaten in *E. coli*

Für die Expression von *auaA* und seinen mutierten Derivaten wurde der Expressionsstamm *E. coli* M15 [pREP4] verwendet. 1 l TB-Medium (mit je 50 µg/ml Carbenicillin und Kanamycin) wurde mit 1 % einer Übernachtskultur in LB-Medium (je 50 µg/ml Carbenicillin und Kanamycin) inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.7 kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei 37 °C durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0.5 mM. Die Zellen wurden 4 h nach Induktion durch Zentrifugation (Sorvall RC6 Plus Zentrifuge, Firma Thermo Scientific, Dreieich) pelletiert (9000 x g, 10 min, 4 °C), zwei Mal in je 100 ml eiskalten 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 7.5) gewaschen und bei - °C gelagert.

2.6.9.2 Expression von *fgaPT2* und mutierten Derivaten in *E. coli*

Für die Expression von *fgaPT2* und seinen mutierten Derivaten wurden die Bedingungen gewählt, wie sie zuvor für *fgaPT2* beschrieben wurden (Steffan *et al.*, 2007). 1 l TB-Medium (mit 35 µg/ml Chloramphenicol und 50 mg/ml Kanamycin) wurde mit 1 % einer Übernachtskultur in LB-Medium (mit 35 µg/ml Chloramphenicol und 50 mg/ml Kanamycin) inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.7 kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei 21 °C durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0.5 mM. Die Zellen wurden 6 h nach Induktion durch Zentrifugation (Sorvall RC6 Plus, Firma Thermo Scientific, Dreieich) pelletiert (9000 x g, 10 min, 4 °C) und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.6.9.3 Expression von *ftmPT1* und mutierten Derivaten in *E. coli*

Die Expression von *ftmPt1* und seinen mutierten Derivaten erfolgte unter denselben Bedingungen, wie sie zuvor für *ftmPT1* beschrieben wurden (Grundmann & Li, 2005). 1 l LB-Medium (mit 50 µg/ml Carbenicillin) wurde mit 1 % einer Übernachtskultur ebenfalls in LB-Medium (mit 50 µg/ml Carbenicillin) inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.7 kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei 30 °C durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0.1 mM. Die Zellen wurden 16 h nach Induktion durch Zentrifugation (Sorvall RC6 Plus, Firma Thermo Scientific, Dreieich) pelletiert (9000 x g, 10 min, 4 °C) und anschließend bei -20 °C eingefroren.

2.6.9.4 Expression von *7-dmats* und mutierten Derivaten in *E. coli*

Die Bedingungen zur Expression von *7-dmats* und seinen mutierten Derivaten wurden, wie zuvor für *7-dmats* publiziert (Kremer *et al.*, 2007), gewählt. 1 l LB-Medium (mit 50 µg/ml Carbenicillin) wurde mit 1 % einer Übernachtskultur ebenfalls in LB-Medium (mit 50 µg/ml Carbenicillin) inokuliert und bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.7 kultiviert. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei 37 °C durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0.8 mM. Die Zellen wurden 16 h nach Induktion durch Zentrifugation (Sorvall RC6 Plus, Firma Thermo Scientific, Dreieich) pelletiert (9000 x g, 10 min, 4 °C) und anschließend bei -20 °C eingefroren.

2.7 Methoden der Biochemie

2.7.1 Gewinnung von Enzymextrakten aus *E. coli* M15 [pREP] nach Expression von *auaA*

2.7.1.1 Rohextrakt-Herstellung

Zur Gewinnung von Rohextrakten nach Expression von *auaA* wurden die gefrorenen Zellpellets aufgetaut und in 1 ml Lysepuffer (2.3.3.3) pro 1 g Feuchtmasse resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen mit einem Sonifier 250 (Branson, Danbury) sechs Mal je 10 s lang bei 200-300 W aufgeschlossen.

2.7.1.2 Zellextrakt-Gewinnung

Der Rohextrakt (2.7.1.1) aus 1 l Zellkultur wurde durch Zentrifugation (Fresco 17 Zentrifuge, Firma Heraeus, Hanau) bei 13000 x g für 30 min (4°C) von Zelltrümmern befreit und wenn

nicht anders beschrieben über eine Sephadex™ G 25 PD-10 Säule von niedermolekularen Substanzen gereinigt und in Aufbewahrungspuffer (2.3.3.3) oder in 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 7.5) umgepuffert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.7.1.3 Isolierung der Membranfraktionen aus *E. coli* M15 [pREP] nach Expression von *auaA* und seinen mutierten Derivaten

Membranfraktionen aus 1 l Kultur wurden durch Ultrazentrifugation (Sorvall MTX150 Mikro Ultrazentrifuge, Thermo Scientific, Dreieich) der entsalzten Zellextrakte (2.7.1.2) bei 200000 x g für 90 min gewonnen. Das Pellet wurde mit 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 7.5) gewaschen und erneut für 90 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in demselben Puffer resuspendiert.

2.7.2 Gewinnung von löslichen rekombinanten Proteinen aus *E. coli*

Die Herstellung von Zellextrakten aus *E. coli* erfolgte nach der in Protokoll 9 des QIAexpressionist™ (Qiagen, Hilden) beschriebenen Methode. Der Kulturansatz wurde 10 min bei 9000 x g und 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC6 Plus, Firma Thermo Scientific, Dreieich). Das erhaltene Zellpellet wurde in 1-5 ml Lysepuffer pro 1 g Feuchtmasse resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Sonifier 250), wobei die Suspension sechs Mal je 10 s bei 200-300 W beschallt wurde. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (Fresco 17 Zentrifuge, Firma Heraeus, Hanau) bei 13000 x g für 30 min (4 °C) wurde der Überstand für weitere Arbeiten verwendet.

2.7.3 Reinigung von His-tag-fusionierten Proteinen mittels Affinitätschromatographie

Die Reinigung rekombinanter His-tag Proteine aus 1 l Kultur wurde gemäß der in Protokoll 12 des QIAexpressionist™ (Qiagen, Hilden) beschriebenen Methode vorgenommen. Pro 1 ml Zellextrakt aus 0.2-1.0 g Zellen (2.7.2) wurden 0.1-0.3 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Gemisch wurde für mindestens 1 h auf Eis gerührt und anschließend in eine leere Hülse gefüllt. Nach zwei Waschschritten mit je 6 ml Waschpuffer (2.3.3.3) wurde das His-tag Protein drei Mal mit je 1.5 ml Elutionspuffer (2.3.3.3) eluiert, über Sephadex™ G 25 PD-10 Säulen in Aufbewahrungspuffer (2.3.3.3) umgepuffert und bei -80 °C gelagert.

2.7.4 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Prüfung von Proteinmustern erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe von SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen in einem diskontinuierlichen System. Das Gelsystem bestand aus einem 4 %igen Sammelgel zur Fokussierung und einem 12 %igen Trenngel (2.3.3.3) zur Trennung der Proteine aufgrund ihrer Größe. Die Separation erfolgte in einer Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese-Zelle (BioRad, München), wobei alle verwendeten Puffer und Lösungen (2.3.3.2) nach Angaben des Herstellers vorbereitet wurden. Unmittelbar vor der Elektrophorese wurden die Proben mit Probenpuffer-Puffer versetzt (0.2-faches Volumen) und 5 min bei 100 °C denaturiert. Zur Trennung der Proteine wurde eine Spannung von 180-200 V angelegt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele ca. 5 min in Fixierlösung (2.3.3.2) getaucht. Zur unspezifischen Proteinfärbung wurden die Gele für 20 min in Coomassie Brilliant Blau-Lösung inkubiert und anschließend so lange in Entfärberlösung geschwenkt, bis die Proteinbanden erkennbar waren.

2.7.5 Western Blot

Das Western Blot Verfahren diente zum Nachweis der Expression von *auaA* und seinen mutierten Derivaten mit Hilfe von Antikörpern. Alle hierfür verwendeten Puffer und Lösungen sind unter 2.3.3.4 aufgeführt. Die Proteine aus Membranfraktionen von *E. coli* (2.7.1.3) wurden mittels SDS-PAGE (2.7.4) aufgetrennt und anschließend in einer Semitrockenblotkammer (Sammy Dry, Schleicher & Schuell, Dassel) mit diskontinuierlichem Puffersystem auf eine PVDF-Membran transferiert. Dafür wurden auf die Anodenplatte zwei Blätter des in Anodenpuffer I und ein Blatt des in Anodenpuffer II zuvor getränkten GB004 Gel-Blotting-Papiers (Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt. Nach Entfernung vorhandener Luftblasen folgten die PVDF-Membran (zuvor 5 min in Methanol getränkt), das Gel (5 min in Kathodenpuffer äquilibriert) und drei Blätter des in Kathodenpuffer getränkten GB004 Gel-Blotting-Papiers. Nachdem vorhandene Luftblasen durch Ausrollen mit einer Pasteurpipette entfernt wurden, wurde das Blotsandwich mit der Kathodenplatte verschlossen. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0.8 mA/cm² Gel über 30 min. Um die Intensität der Banden zu erhöhen, wurde die PVDF-Membran im Anschluss an den Western Blot zwei Mal mit dem PBST-Puffer gewaschen, 15 min bei 55 °C mit dem Stripping-Puffer behandelt und erneut in PBST-Puffer gewaschen. Die nachfolgenden Schritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blockierlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST-Puffer erfolgte eine zweistündige Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (Monoklonaler Maus Anti-His-tag Antikörper, Calbiochem). Die Membran wurde anschließend drei Mal in PBST-

Puffer gewaschen und für 60 min mit einem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich) inkubiert. Beide Antikörper wurden vor Gebrauch im Verhältnis 1:1000 in PBST-Puffer verdünnt. In den nachfolgenden Waschschritten wurde die Membran drei Mal in PBST-Puffer und drei Mal im Farbreaktionspuffer gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran in Färbelösung bis eine deutliche Färbung der Banden sichtbar war.

2.7.6 Bestimmung von Molekulargewicht und Konzentration von Proteinen

2.7.6.1 Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen im SDS-Gel

Die relativen Molekulargewichte der Proteine wurden nach Durchführung der SDS-PAGE (2.7.4) mit Hilfe von mitgeführten Referenzproteinen bestimmt. Hierbei wurde das Low Molecular Weight Calibration Kit zur SDS Gelelektrophorese (GE Healthcare, Freiburg) mit folgenden Proteinen verwendet: Phosphorylase B (97.0 kDa), Albumin (66.0 kDa), Ovalbumin (45.0 kDa), Carboanhydrase (30.0 kDa), Trypsin-Inhibitor (20.1 kDa) und α -Lactalbumin (14.4 kDa). Durch halblogarithmische Auftragung der Molekulargewichte gegen die jeweilige Wanderungstrecke wurde eine Kalibrationsgerade erstellt, aus der das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins bestimmt wurde.

2.7.6.2 Konzentrationsbestimmung anhand von Marker-Banden im SDS-Gel

Die Bestimmung der Konzentration gereinigter His-tag Proteine erfolgte durch einen Vergleich der Bande des jeweiligen Proteins im SDS-Gel mit den definierten Konzentrationen der Marker-Banden.

2.7.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Probe wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Bildung eines Farbstoff-Protein-Komplexes, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Serva Blau G von der Wellenlänge 465 nm auf 595 nm verschoben wird. Dabei ist die Intensität des Farbkomplexes direkt vom Proteingehalt abhängig.

Für die Erstellung einer Kalibrationsgeraden wurden Proben mit BSA (10-100 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. 100 μl der Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und 5 min inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Extinktion bei $\lambda=595\text{ nm}$ mit einem UV-1602 Photometer (Shimadzu, Duisburg).

2.7.7 Enzym-Assays

Alle Assays wurden, wenn nicht anders angegeben in TrisHCl (pH 7.5) durchgeführt. Die Vorbereitung der Assays erfolgte stets auf Eis. Wenn möglich, wurde ein Mastermix hergestellt und anschließend aliquotiert. Substrate wurden nach Möglichkeit in 50 mM TrisHCl (pH 7.5) gelöst, sonst in DMSO.

2.7.7.1 AuaA-Aktivitätsassays

Die Reaktionsgemische wurden in 50 mM TrisHCl-Puffer (pH 7.5) mit 5 mM $MgCl_2$ durchgeführt und die Inkubationstemperatur betrug 30 °C. Die Assays unterschieden sich in Volumen, Inkubationsdauer, verwendeten Proteinmengen und Substratkonzentrationen. Alle Assays wurden nach Ablauf der Inkubationszeit drei Mal mit 2-fachem Volumen an Ethylacetat ausgeschüttelt und die organischen Phasen wurden *in vacuo* entfernt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde der Rückstand in 200 µl Methanol gelöst und mittels HPLC analysiert. Als Negativkontrolle wurde entsalzter Zellextrakt oder die Membranfraktion aus *E. coli* Zellen mit dem Expressionsvektor pQE60 ohne Insert verwendet.

Assays zur Lokalisation der AuaA-Aktivität in der Membranfraktion

Ein Standardassay (200 µl) enthielt 1 mM 2-Methyl-4-Hydroxychinolin, 1 mM FPP und 47.3 µl der jeweiligen isolierten Fraktion. Die Inkubation der Reaktionsgemische erfolgte für 30 min bei 30 °C.

Assays von AuaA mit Chinolinderivaten

Ein Standardassay (200 µl) enthielt 1 mM 2-Methyl-4-Hydroxychinolin oder ein Analogon, 1 mM FPP und 1.0 mg Gesamtprotein aus entsalztem Zellextrakt. Die Inkubation der Reaktionsgemische erfolgte für 10 min bei 30 °C.

Die Assays zur Isolierung der enzymatischen Produkte (5-35 ml) enthielten 1 mM Chinolinderivat, 2 mM FPP und 12.9 mg Gesamtprotein aus entsalztem Zellextrakt pro 1 ml Assay. Nach der Inkubation für 16 h bei 30 °C wurden die Assays mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die organische Phase am Rotationsverdampfer zum Trocknen eingeeengt. Die Rückstände wurden in 500 µl Methanol gelöst und die enzymatischen Produkte mittels HPLC isoliert.

Assays von AuaA und seinen mutierten Derivaten

Assays zum Vergleich der enzymatischen Aktivitäten von AuaA und mutierten Derivaten (200 µl) enthielten 1 mM 2-Methyl-4-Hydroxychinolin, 2 mM FPP und 610 µg gereinigter Membranfraktion. Die Inkubation der Assays erfolgte für 16 h.

Standardassays (200 µl) zur Untersuchung der Akzeptanz von AuaA und seinem mutierten Derivat AuaA_R53A gegenüber Flavonoiden enthielten 1 mM Flavonoid, 1 mM FPP, GPP oder DMAPP und 2.6 mg Gesamtprotein aus entsalzten Zellextrakten. Die Inkubation erfolgte für 16 h.

Die Assays zur Bestimmung der Substratspezifität von AuaA_R53A gegenüber ausgewählten Chinolinderivaten (200 µl) wurden für 60 min mit 1 mM Chinolinderivat, 1 mM FPP und 1 mg Gesamtprotein aus entsalztem Zellextrakt inkubiert.

2.7.7.2 Assays zu Mutageneseversuchen von FgaPT2, 7-DMATS und FtmPT1

Alle Enzym-Assays wurden, wenn nicht anders beschrieben, in einem Volumen von 100 µl durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 30 oder 37 °C. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1-fachem Volumen Methanol beendet. Die so gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 13000 x g pelletiert und die Überstände mittels HPLC analysiert. Als Negativkontrolle wurde in der Regel bei 100 °C für 20 min hitzeinaktiviertes Enzym eingesetzt.

Assays von FgaPT2 und mutierten Derivaten

Standardassays zur Bestimmung der Aktivität von FgaPT2 und seinen mutierten Derivaten wurden unter den zuvor für Wildtyp FgaPT2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt und analysiert (Steffan *et al.*, 2007). Die Reaktionsgemische enthielten 1 mM L-Tryptophan oder Tryptophanderivat, 1 mM DMAPP, 5 mM CaCl₂, und 1 µg gereinigtes Protein. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 30 °C. Die Assays zur Inkubation für 16 h wurden entsprechend vorbereitet, enthielten aber 2 mM DMAPP und 20 µg Protein.

Assays von 7-DMATS und mutierten Derivaten

Standardassays zur Bestimmung der Aktivität von 7-DMATS und seinen mutierten Derivaten wurden unter den zuvor für Wildtyp 7-DMATS beschriebenen Bedingungen durchgeführt und analysiert (Kremer *et al.*, 2007). Die Reaktionsgemische enthielten 1 mM L-Tryptophan oder Tryptophanderivat, 1 mM DMAPP, 10 mM CaCl₂, und 3 µg gereinigtes Protein. Die

Inkubation erfolgte für 45 min bei 37 °C. Die Assays zur Inkubation für 16 h wurden entsprechend vorbereitet, enthielten aber 2 mM DMAPP und 8 µg Protein.

Assays von FtmPT1 und mutierten Derivaten

Standardassays zur Bestimmung der Aktivität von FtmPT1 und seinen mutierten Derivaten wurden unter den zuvor für Wildtyp FtmPT1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt und analysiert (Grundmann & Li, 2005). Die Reaktionsgemische enthielten 1 mM Brevianamid F, 0.5 mM DMAPP, 5 mM MgCl₂, und 0.5 µg gereinigtes Protein. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 30 °C.

2.7.7.3 Assays zur Herstellung diprenylierter Indolderivate

Tandeminkubationen wurden mit 1 mM L-Tryptophan bzw. Tryptophanderivat, 2 mM DMAPP, 1.7 µM FgaPT2 oder 7-DMATS und 10 mM CaCl₂ in 50 mM TrisHCl (pH 7.5) bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden für 16 h mit dem ersten Enzym inkubiert, anschließend wurden das zweite Enzym (1.7 µM) sowie 2 mM DMAPP zugegeben und die Inkubation wurde für weitere 16 h fortgesetzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1-fachem Volumen Methanol beendet. Die so gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 13000 x g pelettiert und die Überstände mittels HPLC analysiert.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.8.1.1 Geräte, Säulen und Fließmittel

Zur Analyse und Isolierung niedermolekularer Substanzen dienten HPLC-Anlagen (Serien 1100 und 1200) der Firma Agilent (Böblingen), die mit RP-Fertigsäulen (C&S Chromatographie Service, Düren) ausgestattet waren.

In der Regel erfolgte die Trennung der Substanzen mit einer Flussrate von 1 ml/min über eine Multopsher RP-18-Säule (250 mm x 4 mm, 5 µm), der eine Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm x 4 mm x 40 µm) vorgeschaltet war. Die zur Trennung verwendeten Fließmittelkomponenten sind in Tabelle 2-13 zusammengefasst.

Tabelle 2-13: Fließmittel zur Trennung niedermolekularer Substanzen mittels HPLC.

Bezeichnung	Fließmittel
A	bidest. Wasser
B	bidest. Wasser + 0.1 % Ameisensäure
C	bidest. Wasser + 0.5 % TFA
D	Methanol
E	Methanol + 0.1 % Ameisensäure
F	Methanol + 0.5 % TFA
G	Acetonitril
H	Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure
I	Acetonitril + 0.5 % TFA

Die Detektion erfolgte mittels DAD-Durchflussdetektoren. Wenn nicht anders beschrieben, wurde die Absorption bei 277 nm abgebildet. Steuerung und Auswertung wurden mit Hilfe der ChemStation Software vorgenommen.

2.8.1.2 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte von AuaA

Assays von AuaA und seinen Mutanten mit Chinolinderivaten wurden an einer Agilent 1200 bei einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus den Fließmitteln C und F. Die Trennung erfolgte zunächst durch Elution mit 50 % Fließmittel F für 5 min, gefolgt von einem linearen Gradienten von 50-100% Fließmittel F für 25 min. Nach einer Waschphase von 5 min mit 100 % Fließmittel F wurde die Säule für 5 min mit 50 % desselben Fließmittels äquilibriert. Die Detektion erfolgte bei 240, 254 und 334 nm.

Die Isolierung von 3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin, 2-Amino-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin und 3-Farnesyl-4-Hydroxy-7-Chlorochinolin wurde unter denselben Bedingungen vorgenommen. Bei der Isolierung von 2-Methyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin, 2,4-Dihydroxy-3-Farnesylchinolin und 2,6-Dimethyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin wurden Fließmittel A und D verwendet. Die Trennung der Substanzen erfolgte unter den oben beschriebenen Bedingungen.

Die Analyse der Assays mit Flavonoiden erfolgte mit Fließmitteln A und D. Zur Trennung wurde ein linearer Gradient von 50-80 % Fließmittel D in 10 min verwendet, gefolgt von einem Gradienten von 80-100 % in 15 min. Anschließend wurde die Säule mit 100 % Fließmittel D gewaschen und für 5 min mit 50 % Fließmittel D äquilibriert.

2.8.1.3 Analyse der Assays nach Mutagenese ausgewählter basischer Aminosäuren in FgaPT2, 7-DMATS und FtmPT1

Die Assays wurden an einer Agilent 1100 unter Verwendung der Fließmittel C und I bei einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Die Trennung erfolgte durch einen linearen Gradienten von 15-70 % Fließmittel I für 15 min. Nach einer Waschphase von 5 min mit 100 % Fließmittel I wurde die Säule für 5 min mit 15 % Fließmittel I äquilibriert.

2.8.1.4 Analyse der Assays nach Mutagenese zur Unterstützung der Strukturaufklärung von FgaPT2

Die Assays wurden an einer Agilent 1200 unter Verwendung der Fließmittel C und F bei einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Die Trennung erfolgte durch einen linearen Gradienten von 50-100 % Fließmittel F in 15 min. Nach einer Waschphase von 5 min mit 100 % Fließmittel F wurde die Säule für 5 min mit 50 % Fließmittel F äquilibriert.

2.8.1.5 Untersuchungen der Assays zur Produktion diprenylierter Indolderivate

Die Analyse der Assays zur Produktion diprenylierter Indolderivate erfolgte wie unter 2.8.1.3 beschrieben.

2.8.1.6 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte nach Mutagenese zur Änderung der Regiospezifität von FgaPT2 und 7-DMATS

Die Assays wurden an einer Agilent 1200 unter Verwendung der Fließmittel C und I bei einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Die Elution erfolgte zunächst für 5 min mit 30 % Fließmittel I, bevor die Konzentration des Fließmittels auf 35 % erhöht und die weitere Trennung für 30 min mit einem linearen Gradienten von 35-40 % Fließmittel I durchgeführt wurde. Nach einer Waschphase von 5 min mit 100 % Fließmittel I wurde die Säule für 5 min mit 30 % Fließmittel I äquilibriert.

Zur Isolierung der enzymatischen Produkte wurden ebenfalls Fließmittel C und I eingesetzt. Die Trennung erfolgte isokratisch mit 25 % Fließmittel I für 65 min. Nach einer Waschphase mit 100 % Fließmittel I für 8 min wurde die Säule mit 25 % Fließmittel I äquilibriert.

2.8.2 Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

2.8.2.1 LC-MS Analyse des enzymatischen Produktes von AuaA und Vergleich mit einem Aurachin D-Standard

Für die LC-MS-Analyse des enzymatischen Produktes von AuaA wurde eine HPLC-Anlage, Serie 1100 (Agilent) mit einem DAD-Durchflussdetektor verwendet, welcher an HCTultra ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer (Brucker Daltonics) gekoppelt war. Die Trennung erfolgte mit Fließmittel B und H bei einer Flussrate von 0.4 ml/min über eine Luna RP-C₁₈ Säule (125 x 2 mm, 2.5 µm) (Phenomenex). Für die Trennung wurde ein linearer Gradient von 5-95 % Fließmittel H in 20 min verwendet. Die Detektion erfolgte im Bereich von 200-600 nm.

2.8.2.2 LC-MS Analyse der diprenylierten Indolderivate

Positive und negative ESI-Messungen wurden mit einem TSQ Quantum Massenspektrometer (Thermo Finnigan) durchgeführt. Der Massendetektor war mit einer Agilent HPLC, Serie 1100 gekoppelt, die mit einer RP-18-Säule (250 mm x 2 mm, 5 µm) ausgestattet war. Als Fließmittel wurden B und E verwendet. Die Trennung erfolgte durch einen linearer Gradienten von 10-100 % Fließmittel E über 30 min. Nach einer Waschphase von 10 min mit 100 % Fließmittel E wurde die Säule 10 min mit 10 % Fließmittel E äquilibriert. Die Flussrate betrug 0.2 ml/min.

2.8.3 Massenspektrometrie

HR-EI-MS-Analyse der enzymatischen Produkte von AuaA erfolgte an einem Autospec-Gerät (Bruker, Herzogenrath).

2.8.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung mittels Kernspinresonanzspektroskopie wurden die Proben mindestens 12 h im Exsikkator getrocknet oder lyophilisiert. Die Messung erfolgte nach Aufnahme der Proben in deuterierten Lösungsmitteln (Merck, Darmstadt). Das Lösungsmittelsignal diente jeweils zur Kalibrierung der chemischen Verschiebung. Auswertung der NMR-Daten erfolgte mit der Software MestReNova (MestreLab Research, S.L., Santiago de Compostela).

Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren der enzymatischen Produkte von AuaA erfolgte an einem JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL, München). Die zu analysierenden Proben wurden in CDCl_3 oder CD_3OD bei 500 MHz aufgenommen.

Aufnahmen der ^1H -, ^1H - ^{13}C -HSQC und HMBC-Spektren der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R erfolgten an einem Bruker Avance 500 MHz Spektrometer (Bruker, Karlsruhe). Als Lösungsmittel wurde $\text{DMSO-}d_6$ verwendet.

3 Ergebnisse

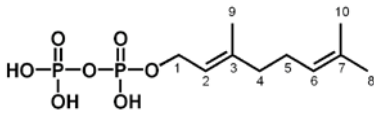
3.1 Synthese von FPP und GPP

Für Untersuchungen von AuaA und anderen Prenyltransferasen wurden FPP und GPP als Prenyldonoren benötigt. Da diese zwar kommerziell erhältlich sind, jedoch zu einem hohen Preis, wurden beide Substanzen nach der von Woodside *et al.* (1988) für GPP beschriebenen Methode synthetisiert.

3.1.1 GPP-Synthese

Bei der Synthese von GPP wurde käuflich erworbenes *trans*-Geranylchlorid mit zuvor hergestelltem Tetrabutylammoniumhydrogendiphosphat (2.4.1.1) phosphoryliert (2.4.1.2). Aus der Reaktion wurden insgesamt 3.0 g Produkt gewonnen, welches in zwei Fraktionen vorlag. ^1H - und ^{31}P -Analysen der beiden Fraktionen (Anhang, 6.1) bestätigten, dass es sich bei dem vorliegenden Produkt um GPP handelte (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: ^1H -NMR-Daten von GPP. Die Spektren wurden in D_2O bei 400 MHz aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> <div>GPP</div> <div>  </div> </div>			
	Fraktion 1	Fraktion 2	Woodside <i>et al.</i> , 1988
Proton	Gemessene Multiplizität, δ	Gemessene Multiplizität, δ	Multiplizität, δ
H-1	4.44, t (6,7)	4.45, t (6,7)	.4.47, dd (6,0; 6,0)
H-2	5.42, tbr (7,1)	5.43, tbr (7,2)	.5.46, t (6,4)
H-4	2.06, t (6,9)	2.07, t (6,8)	.2.11, m
H-5	2.13, m	2.13, m	2.11, m
H-6	5.18, tbr (6,7)	5.18, tbr (6,8)	.5.15, m
H-8	1.68, s ^[a]	1.69, s ^[b]	.1.72, s ^[c]
H-9	1.65, s ^[a]	1.66, s ^[b]	.1.68, s ^[c]
H-10	1.59, s ^[a]	1.60, s ^[b]	.1.62, s ^[c]

^[a]^[c] Die Zuordnung der Signale mit gleichen Buchstaben ist austauschbar

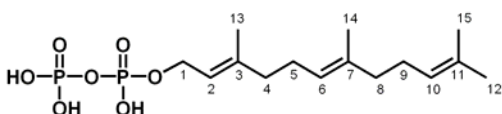
Die NMR-Daten waren mit den Literaturangaben vergleichbar. Neben den Signalen für GPP wurden nur sehr schwache Signale von Nebenprodukten in den ^{31}P -NMR Spektren detektiert. Zwei Duplette bei -7.9 ppm und -10.1 ppm deuteten auf die Anwesenheit von

gewünschtem GPP hin. Zusätzlich wurden Singulette bei -7.73 ppm und -10.37 ppm detektiert. Diese wurden von Hydrolyseprodukten wie z.B. $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, Phosphat (PO_4^{3-}) oder Geranylphosphat-Dimeren (GP)₂ verursacht. Um die Reinheit des hergestellten GPP zu bestimmen, wurden die Flächen der zusätzlichen Signale ebenfalls integriert und deren Anteil an der Gesamtfläche berechnet. Das Ergebnis zeigte, dass Fraktion eins (2.9 g) eine Reinheit von 96 % und Fraktion zwei (0.1 g) eine Reinheit von 90 % aufwies.

3.1.2 FPP-Synthese

Die Synthese von FPP ging von *trans*-Farnesylchlorid aus und verlief analog zu der oben beschriebenen Synthese von GPP. Auf diese Weise konnten insgesamt 1.9 g Produkt in drei Fraktionen gewonnen werden. Durch ^1H - und ^{31}P -Analysen (Anhang, 6.2) der drei Fraktionen wurde das erhaltene Syntheseprodukt als FPP bestätigt (Tabelle 3-2). Nach Auswertung der Daten wurde der FPP-Gehalt der ersten Fraktion (610 mg) als 94.5 % berechnet, während Fraktionen zwei (780 mg) und drei (500 mg) 92.7 % bzw. 94.6 % FPP enthielten.

Tabelle 3-2: ^1H -NMR-Daten von FPP. Die Spektren wurden in D_2O bei 500 MHz aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> <div>FPP</div> <div>  </div> </div>			
	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3
Proton	Gemessene Multiplizität, δ	Gemessene Multiplizität, δ	Gemessene Multiplizität, δ
H-1	4.50, t (6.8)	4.50, t (6.8)	4.50, t (6.6)
H-2	5.48, t (7.1)	5.48, t (7.1)	5.48, t (6.9)
H-4	2.03, t (7.4) ^[a]	2.03, t (7.3) ^[d]	2.03, t (7.3) ^[g]
H-5	2.11, m ^[b]	2.11, m ^[e]	2.11, m ^[h]
H-6	5.23, m	5.20, m	5.22, m
H-8	2.11, m ^[a]	2.11, m ^[d]	2.11, m ^[g]
H-9	2.16, m ^[b]	2.16, m ^[e]	2.16, m ^[h]
H-10	5.23, m	5.20, m	5.22, m
H-12	1.74, s ^[c]	1.72, s ^[f]	1.74, s ^[i]
H-13	1.71, s ^[c]	1.69, s ^[f]	1.71, s ^[i]
H-14	1.64, s ^[c]	1.62, s ^[f]	1.64, s ^[i]
H-15	1.64, s ^[c]	1.62, s ^[f]	1.57, s ^[i]

^{[a]-[i]} Die Zuordnung der Signale mit gleichen Buchstaben ist austauschbar

3.2 Klonierung und Charakterisierung der Farnesyltransferase AuaA aus *Stigmatella aurantiaca*

3.2.1 Einleitung

Aurachine gehören zu der Gruppe der Isoprenoidchinolinalkaloide und wurden zuerst aus den Myxobakterien *Stigmatella aurantiaca* und *Stigmatella erecta* isoliert (Höfle *et al.*, 2008). Als weitere Produzenten dieser Naturstoffe wurden später auch Actinobakterien der Gattung *Rhodococcus* beschrieben (Kitagawa & Tamura, 2008; Nachtigall *et al.*, 2010).

Vor wenigen Jahren wurde im Genom von *S. aurantiaca* Sg a15 ein putatives Gencluster zur Biosynthese von Aurachinen identifiziert (Sandmann *et al.*, 2007). Dieses Cluster enthielt fünf Gene (*auaA-auaE*), für deren Produkte zu Beginn dieser Arbeit kein funktioneller Nachweis vorlag. Das Genprodukt AuaA sollte für eine putative Farnesyltransferase kodieren, welche einen Farnesylrest von FPP auf 2-Methyl-4-Hydroxychinolin transferiert. Als Produkt dieser Reaktion wurde 2-Methyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin (Aurachin D) erwartet. Zur Überprüfung der für AuaA vorgeschlagenen Funktion sollte das Gen *auaA* zunächst in *E. coli* überexprimiert und das Genprodukt biochemisch charakterisiert werden. Ausgangspunkt der Arbeiten war die genomische DNA von *S. aurantiaca* Sg a15, die von Prof. Müller aus Saarbrücken zur Verfügung gestellt wurde.

3.2.2 Sequenzanalyse von *auaA*

Die DNA-Sequenz von *auaA* (AM404078) hat eine Länge von 981 bp und kodiert für ein Polypeptid aus 326 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 36.6 kDa. Eine Aminosäuresequenzanalyse des Genprodukts von *auaA* mit Hilfe des Programms SOSUI (2.6.8) zeigte, dass es sich um ein Transmembranprotein mit zehn Transmembranhelices handelt (Abbildung 3-1).

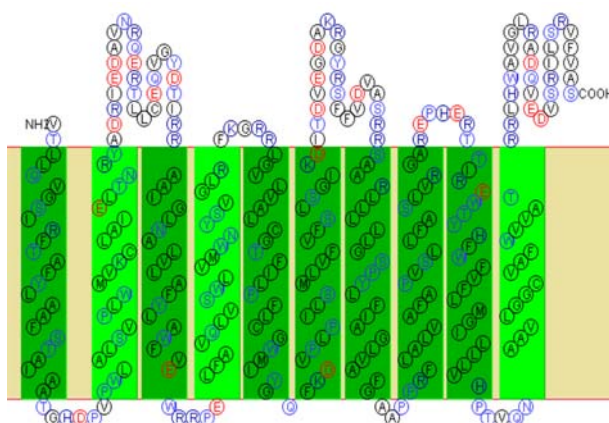


Abbildung 3-1: Strukturvorhersage für die putative Prenyltransferase AuaA mit dem Programm SOSUI.

AuaA zeigt nur geringe Sequenzähnlichkeiten zu anderen charakterisierten membran- gebundenen Prenyltransferasen. Es konnte z.B. eine Sequenzidentität von 34.5 % zu MenA aus der Biosynthese von Menachinon (Suvarna *et al.*, 1998) und von 25.3 % zu UbiA aus der Biosynthese von Ubichinon aus *E. coli* (Melzer & Heide, 1994) festgestellt werden. Zu weiteren membrangebundenen Prenyltransferasen, die Sequenzähnlichkeiten zu AuaA aufweisen, gehört die Homogenisat-Prenyltransferase HPT aus *Arabidopsis thaliana* (Collakova & DellaPenna, 2001) mit einer Sequenzidentität von 27.1 % auf Aminosäureebene oder LePGT1 aus *Lithospermum erythrorhizon* mit einer Identität von 26.7 %. Durch einen multiplen Sequenzvergleich der Aminosäuresequenz von AuaA mit Aminosäuresequenzen einiger charakterisierter membrangebundener Prenyltransferasen konnten zwei konservierte aspartatreiche Motive in allen analysierten Sequenzen (Abbildung 3-2) identifiziert werden.

Das erste Motiv soll für die Bindung des Prenyldiphosphates mit Hilfe von divalenten Metallionen verantwortlich sein (Sasaki *et al.*, 2008) und kann in einzelnen Aminosäuren variieren (NDxxDxxxD, NQxxDxxxD, DDxxDxxxD, DQxxDxxxD DQxxExxxD und NQxxExxxD). Motiv II (DxxxDxxxG) dagegen soll die Erkennung des aromatischen Substrates vermitteln (Bräuer *et al.*, 2008; Ohara *et al.*, 2009). Zum Beispiel sollte die konservierte Sequenz KD(I/L)xDxE₂GD im zweiten Motiv für Flavonoid- bzw. Homogenisat- Prenyltransferasen charakteristisch sein (Akashi *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2011), was bisher jedoch nicht experimentell nachgewiesen wurde.

EcUbiA	1	-----	1
EcMenA	1	-----	1
SaAuaA	1	-----	1
ScCoq2	1	-----MFIWQRKSI LLGRSILGSGRVTVAG-----IIGSSRKRYTSSSSSSSSPSSKES-	49
AtHPT	1	-----MESLLSS----SSLVSAAGGFCWKKQNLKLSLS-----EIRVLRCDSSKVVAKPKFRNNLVRP	55
OsPPT1	1	MALLRAAAAADLLRRHRRAPLPLLSALSPPPTTPESC PDGSPVAPYFAPPPPLCRRRRSWPPPPPPRVSSSSSYVG	80
LePGT1	1	-----	1
SfN8DT	1	-----MGSMLLASFPGASSITTTGGSC LRSKQYAKNYDASSYVTTSWYKKRKIQKEHCAAIFSKHNKQHYKVN	68
EcUbiA	1	-----MEWSLTQN-----KLLAFHRLMRTDKPIGALLLLWPTLWA	35
EcMenA	1	-----MTEQQISRTQAWLES LRPKTLPLAFAAIIVGTALA	35
SaAuaA	1	-----VTLLQVGSIRFTAFYLAAFS	20
ScCoq2	49	-----APVFTSKELEVARKERLDGLG-----PFVSR-LPKKWIPYAE LMRLEKPVGTWLLYLPCSW	105
AtHPT	56	DGQGSLLLYPKHKS RFRVNATAGQ-----PEAFDSNSKQKSF RDSLD AFYRFSRPHTVIGTVLSILSV	119
OsPPT1	81	RGILLPATFSIYSPLSTSSASPDGSPDEDSSPPHPSPAAAPSSWDRWLPQAARPYAMLARLDKPIGTWLLAWPCFWS	160
LePGT1	1	-----MVSSKQTQLKKGKQ-----PSWIEMYLPEKVRPYAHLARLDKPIGSWLLAWPAFWS	51
SfN8DT	69	EG-GSTSNTSKECEKKYVNAISEQSFEYE-----PQTRDPESIWDSVNDALDIFYKFCRPYAMFTIIVLGATFK	136
Motiv I			
EcUbiA	36	LWVATPGVPQLW----ILAVFVAGVWLMRAAGCVVNDYADRKFDGHWKRTANRPLPSGAVTEKEA-RALFVVLVLISFL	109
EcMenA	36	WWQGHFDPLVAL-----LALITAGLLQILSNLNDYGD AVKGS DKPDRIGPLRGMQKGVITQQEMKRALIITVVLIC	107
SaAuaA	21	TAIAATGHDPVP----WLALS VPLWVMVKCLAIELTNR YADRIEDAVNRQERTLLCEQVGYDTIRRAAIGLNALVLA FYL	95
ScCoq2	106	ILMGAMMQATLSATAGMLGIFGVGALVMRGACCTINDFLDRKLDQRVIRSV ERPIASGRVSPRRA-LVFLGAQTLVGMG	184
AtHPT	120	SFLAVEKVS DISPLFTGILEAVVAALMMNIYIVGLNQLSDVEIDKVNK--PYLPLASGEYSVNTG-IAIVASF SIMSFW	196
OsPPT1	161	ISMAAMPGLPD---MRMLALFGCGAVLLRGACCTVNDLLDRDIDNKVERTKSRPFASGILTPTQG-VGFLGLQLLLGLG	236
LePGT1	52	VALAADLES LP----KMLAIFGWWAVWIRGACCTINDYFDRNFDKKVERTKSRPLASGAVSPAQG-LWWLAFQLFIGLG	125
SfN8DT	137	SLVAVEKLS DLSLAFFIGWLQVVVAVICIHIFGVGLNQLCDIEIDKINK--PDLPLASGKLSFRNV-VIITASSLILGLG	213
EcUbiA	110	LVLTLNTMT--ILLSIAALALAWV-----YPFMKR---YTHLPQVVLGA AFWSIPMAFAAVS--ESVPLSC	169
EcMenA	108	LSGLALVAVAC--HTLADFVGFLILGG---LSIIAAITYTVGNRPYGYIGLGDISVLVFFGWLSVMGSWYLQAH TLIPAL	182
SaAuaA	96	AWFVEWRRPELFAVQLVSWLVMWN-----YSVGLRFKGRRLGLVVALCGTFILPFLCGWMIYQGFKDVPLPI	162
ScCoq2	185	VLSLLPAQC--WWLGLASLPVFT-----YPLFKR---FTYYPQAALSACFNW GALLGFPMGV-MSWP-TM	244
AtHPT	197	LGWIVGWSW--LFWALFVSFMLGTAYSINLPLL RWRKFALVAA--MCILAVRAIIVQIAFYLHIQTHVFGRPILFTRPL	271
OsPPT1	237	ILLQLNNYS--RILGASSLFLVFS-----YPLMKR---FTFWPQAYLGLTFNWGALLGWAAIKE-SLDP AII	297
LePGT1	126	VLYQFNVL T--LALAIVHVPFVFA-----YPLMKR---ITYWPQAF LGVMISWGALLGSSALKG-SVVP SIA	186
SfN8DT	214	FAWIVDSWP--LFWTVFISCMVASAYNVDLPLL RWKYPVLT A--INFIADVAVTRSLGFFLHMQTCVFKRPTTFPRPL	288
Motiv II			
EcUbiA	170	WLMFLANILWAVAYDTQYAMVDRDDVDVKIGIKSTAILFGQYDKLIIGI-LQIGVLALMAII---GELNGLGWG---YYWS	242
EcMenA	183	ILPATACGLLATAVLNINLRDINS DRENGKNTLVRLGEVNARRYHACLLMGSLVCLALFNLSLHSLGWLFLLAAPL	262
SaAuaA	163	LS---MLVFVFLSGIKDITDVEGD AKRGYRSEFVDVASRRSAARLLLLLGGSPYLFIAGLVAFGAAPPRFLALVAFAPV	238
ScCoq2	245	IPLYLSSYLWCMTYDTIYAHQDKKFDIKAGIKSTALAWGPRTKSIMKA-MSASQIALLAVA---GLNSGLLWGP-GFIGG	319
AtHPT	272	IFATAFMSFFSVVIALFKDIPDIEGD KIFGIRSESVTLGQKRVFWTCVTLLQ MAYAVAILV---GATSPFIWSKVISVG	348
OsPPT1	298	LPLYTAGICWTLVYDTIYAHQDKEDDLKVGKSTALRFGDLTKHWISG-FGVACIGSLALS---GYSADLAWP---YYPF	370
LePGT1	187	YPLYISSFFWTLVYDTIYAHQDKVDDAKAGIKSTALRFGDATKMWISW-FGVGCIAALVIG---GLILNIGLP---YYVF	259
SfN8DT	289	IFCTAIVSIYAIVIALFKDIPDMEGDEKFGIQSLSLRLGPKRVFWICVSLLEMTYGVTTILV---GATSPILWSKIITVLG	365
EcUbiA	243	ILVAGALFVYQQKLIANRE--REACFKAFMNNNYVGLVFLGLAMS---YWHF-----	290
EcMenA	263	LVKQARYVMREMDPVAMRPLERTVKGALLTNLLFVLGIFLSQWAA-----	308
SaAuaA	239	SLLFASLVRGAREPHERTTIREWYHFVFLMGI LLVHPTVQNAAVLGGCVAFVWVATRRLLHWAVGLRADQVEDVSRI	318
ScCoq2	320	LGVFAYRLFSMIKKVDLDN--PKNCWKYFNANINTGLYFTYALAVDYILRLFGFL-----	372
AtHPT	349	HVILATTLWARAKSVDLSSKTEITSCYMF IWKLFYAEYLLLPFLK-----	393
OsPPT1	371	LAASAQLAWQISTVDLSD--RLDCNRKFVSNKWF GALIFGGVLCG---RLVS-----	418
LePGT1	260	VAIATGQLVWQIFTVDLLS--PLDCGKKFVS NQWFGAIIFTGILLG---RLFP-----	307
SfN8DT	366	HAVLASVLWYHAKSVDLTSNVVLHSFYMF IWKLHTAEYFLIPLFR-----	410
EcUbiA	290	-----	290
EcMenA	308	-----	308
SaAuaA	319	LSRVFVAS	326
ScCoq2	372	-----	372
AtHPT	393	-----	393
OsPPT1	418	-----	418
LePGT1	307	-----	307

Abbildung 3-2: Multipler Sequenzvergleich von AuaA mit einigen charakterisierten membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen aus verschiedenen Organismen. EcUbiA (Accession No. BAB38446) und EcMenA (U56082) sind aus *Escherichia coli*, SaAuaA (AM404078) aus *Stigmatella aurantiaca*, ScCoq2 (P32378) aus *Saccharomyces cerevisiae*, AtHPT (NP849984) aus *Arabidopsis thaliana*, OsPPT1c (BAE96574) aus *Oryza sativa*, LePGT1 (BAB84122) aus *Lithospermum erythrorhizon* und SfN8DT (BAG12671) aus *Sophora flavescens*. Die konservierten Aminosäuren sind dickgedruckt, die für Flavonoid-bzw. Homogenisat-Prenyltransferasen charakteristische Sequenz ist grau unterlegt.

3.2.3 Klonierung von *auaA*

Mit der genomischen DNA von *S. aurantiaca* Sg a15 als *template* wurde ein 991 bp langes Genfragment mit einer NcoI-Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer BglII-Schnittstelle am 3'-Ende amplifiziert (2.6.7.1). Das PCR-Produkt wurde zunächst in einen Klonierungsvektor pGEM®-T easy ligiert. Nach der Bestätigung der erfolgreichen Klonierung durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung des entstandenen Plasmids (pES17), wurde das 981 bp große NcoI-BglII-Fragment mittels Restriktion mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid pES17 isoliert und mit dem ebenfalls mit NcoI und BglII geschnittenen Expressionsvektor pQE60 ligiert (Abbildung 3-3). Das so erhaltene Expressionskonstrukt pES19 wurde zur Transformation von *E. coli* M15 [pREP4] Zellen eingesetzt.

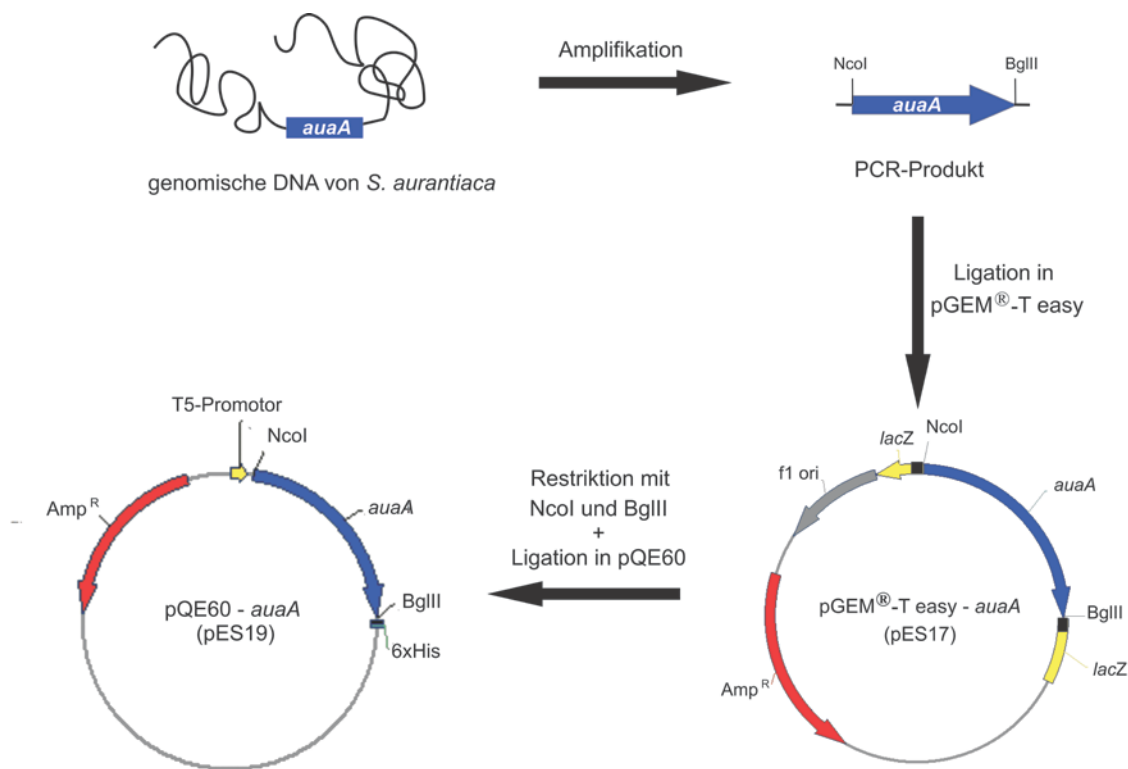


Abbildung 3-3: Strategie zur Klonierung von *auaA* in den Expressionsvektor pQE60.

3.2.4 Überproduktion und Reinigung von AuaA

Nach der Transformation von *E. coli* M15 [pREP4] mit dem Expressionskonstrukt pES19 (2.6.6.2) wurden die Zellen in den frühen logarithmischen Phase mit 0.5 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37 °C kultiviert. Nach Zellernte wurde versucht, das rekombinante His₆-AuaA mittels Affinitätschromatographie über Nickel-NTA-Agarose (2.7.1.1, 2.7.3) aufzureinigen. Dabei wurden die einzelnen Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE (2.7.4) analysiert.

Als Negativkontrolle wurden *E. coli* M15 [pREP4] Zellen mit dem leeren pQE60-Vektor verwendet und gleichem Verfahren unterzogen. Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in (Abbildung 3-4) dargestellt.

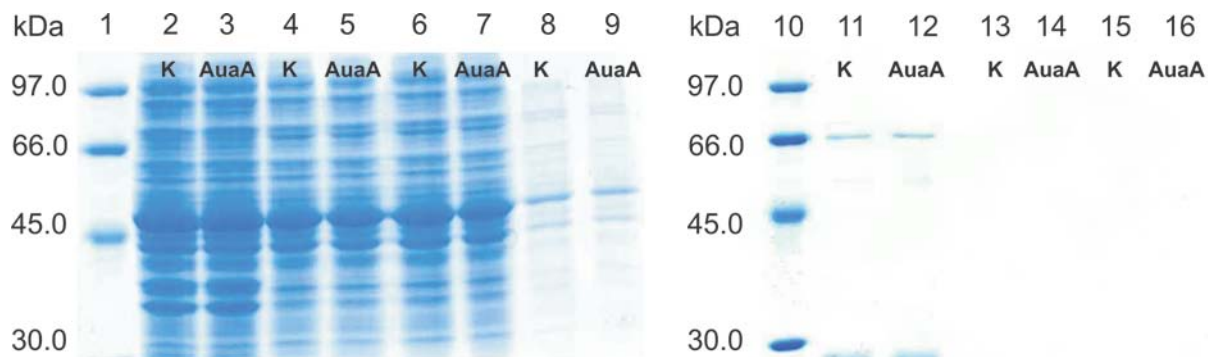


Abbildung 3-4: SDS-PAGE der Reinigung von His₆-AuaA (erwartete Größe 37.4 kDa). 1: Proteingrößenstandard, 2 und 3: Gesamtprotein, 4 und 5: lösliche Fraktion, 6 und 7: Durchlauf-Fraktion, 8 und 9: Waschfraktion, 10: Proteingrößenstandard, 11 und 12: Elutionsfraktion 1, 13 und 14: Elutionsfraktion 2, 15 und 16: Elutionsfraktion 3. K: Negativkontrolle.

Ein Vergleich der Bandenmuster einzelner Fraktionen aus *auaA*-Transformanten mit denen der Negativkontrolle deutete darauf hin, dass in den Transformanten keine deutliche Überproduktion des rekombinanten His₆-AuaA stattgefunden hat. Im Vergleich zu der Negativkontrolle konnte in keiner der AuaA-Fractionen eine zusätzliche oder verstärkte Bande der erwarteten Größe von 37.4 kDa detektiert werden.

3.2.5 Nachweis der Aktivität von AuaA

Einige membrangebundene Enzyme sind mittels SDS-PAGE nicht detektierbar, obwohl sie überproduziert vorliegen und ihre Aktivität nachweisbar ist. Da dies auch für AuaA der Fall sein könnte, wurden zur Überprüfung der Enzymaktivität Assays in Anwesenheit von 2-Methyl-4-Hydroxychinolin und FPP durchgeführt (2.7.7.1). Aufgrund der Tatsache, dass die Aktivität membrangebundener aromatischer Prenyltransferasen strikt abhängig von divalenten Metallionen ist, wurde zu den Assays Mg²⁺ zugegeben. Die Vorbereitung der Assays für eine 16 h Inkubation erfolgte gemäß 2.7.7.1. Für die Assays wurde der Zellextrakt (2.7.1.2) aus rekombinanten *E. coli* M15 Zellen mit pES19 verwendet. Als Negativkontrolle dienten zum einen der Zellextrakt nach Hitzeinaktivierung (20 min, 100 °C) und zum anderen ein Zellextrakt aus *E. coli* M15 mit dem leeren pQE60-Vektor. Wie in Abbildung 3-5 zu sehen ist, konnte im Assay mit aktivem Zellextrakt aus Zellen mit dem Expressionskonstrukt ein Produktpeak bei 25.9 min detektiert werden. Dieser Peak war in keiner der mitgeführten Negativkontrollen sichtbar.

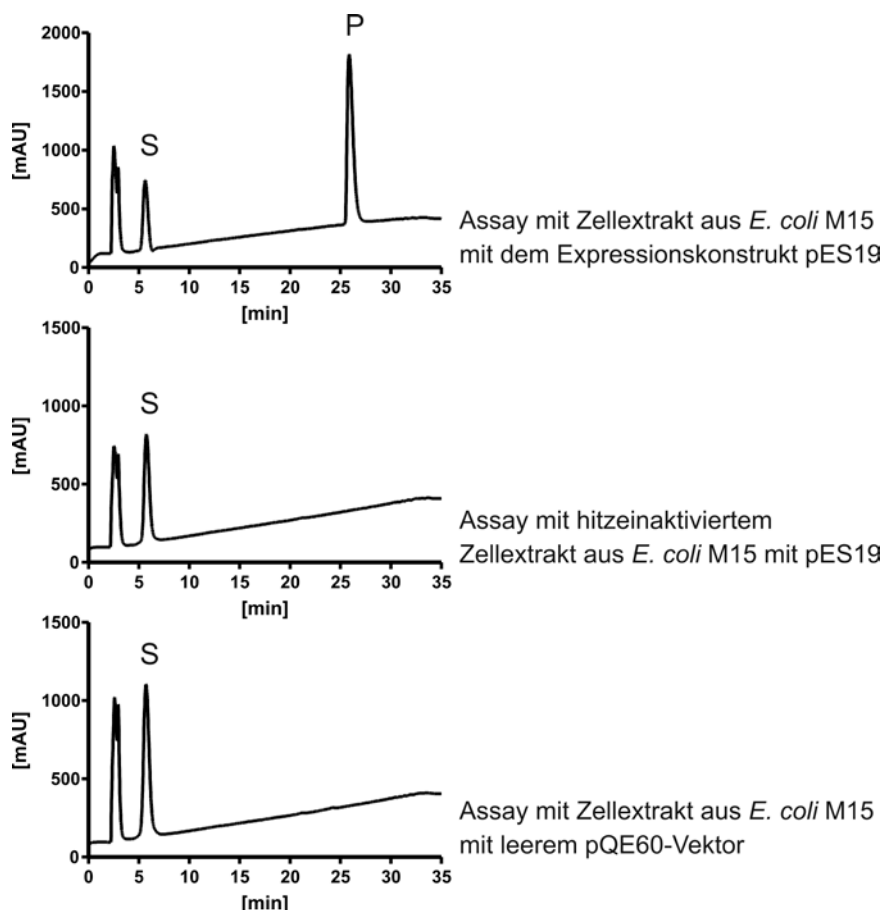


Abbildung 3-5: HPLC-Chromatogramme von Assays zum Nachweis der Aktivität von AuaA in Anwesenheit von 2-Methyl-4-Hydroxychinolin und FPP. Denaturierung des Zellextraktes erfolgte durch Inkubation bei 100 °C für 20 min. S: Substrat, P: Produkt.

Zur Überprüfung des erwarteten Aurachin D, wurden die Aktivitätsassays in der AG von Prof. Müller in Saarbrücken mittels LC-MS analysiert und mit einem Aurachin D-Standard verglichen (2.8.2.1). Die Auswertung der LC-MS-Daten zeigte, dass der Produktpeak im AuaA-Assay sowohl dieselbe Retentionszeit als auch vergleichbare MS und MS/MS-Spektren wie der Standard aufwies (Abbildung 6-11, Anhang). Dieses Ergebnis wurde durch eine anschließende Isolierung des enzymatischen Produktes und seine ^1H -NMR-Analyse (3.2.8) bestätigt.

3.2.6 Subzelluläre Lokalisation von AuaA

Die bioinformatische Analyse der Aminosäuresequenz von AuaA zeigte, dass es sich hierbei um ein integrales Membranprotein handelt (3.2.2). Um dieses nachzuweisen wurde die Membranfraktion aus rekombinanten *E. coli* M15-Zellen mit pES19, durch Ultrazentrifugation isoliert (2.7.1.3) und ihre Gesamtaktivität sowie spezifische Aktivität bestimmt (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Lokalisation der AuaA-Aktivität in der Membranfraktion. Aktivitätsassays (200 µl) enthielten je 47.3 µl der während der Membranisolierung erhaltenen Fraktion und wurden 30 min bei 30 °C inkubiert. Die im Zellextrakt gemessene Aktivität wurde als 100 % gesetzt.

Fraktion	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität		Spezifische Aktivität	
		[nmol/s]	[%]	[pmol/s • mg]	[%]
Zellextrakt	207.2	3.65	100	17.62	100
Überstand	173.6	≤ 0.04	≤ 1	≤ 0.26	≤ 1
Membranfraktion	23.6	3.96	108	79.47	451

Die HPLC-Analyse der Assays zeigte, dass die mittels Ultrazentrifugation pelletierte Membranfraktion mit 108 % eine zu dem Zellextrakt vergleichbare Gesamtaktivität aufwies. In der löslichen Cytoplasmafraktion konnte dagegen keine Aktivität detektiert werden. Zusätzlich zu der Gesamtaktivität wurde auch die spezifische Aktivität aller Fraktionen bestimmt, welche sich als der Quotient aus der Gesamtaktivität und der Proteinmenge der jeweiligen Fraktion ergab. Hier konnte deutlich gezeigt werden, dass die spezifische Aktivität der Membranfraktion um ein 4.5-faches höher war, als die des Zellextraktes. Diese Daten bestätigten die Lokalisierung von AuaA in oder an der Membran von rekombinanten *E. coli* Zellen.

3.2.7 Biochemische Eigenschaften und kinetische Parameter von AuaA

3.2.7.1 Abhängigkeit der Farnesyltransferaseaktivität von Inkubationsdauer und Proteinkonzentration

Es konnte eine lineare Abhängigkeit der Produktbildung durch die Farnesyltransferase AuaA von der Inkubationsdauer von bis zu ca. 30 min beobachtet werden. Des Weiteren zeigte die Reaktion eine lineare Abhängigkeit von der eingesetzten Gesamtproteinmenge bis zu 0.7 mg pro 100µl Assay (Abbildung 3-6).

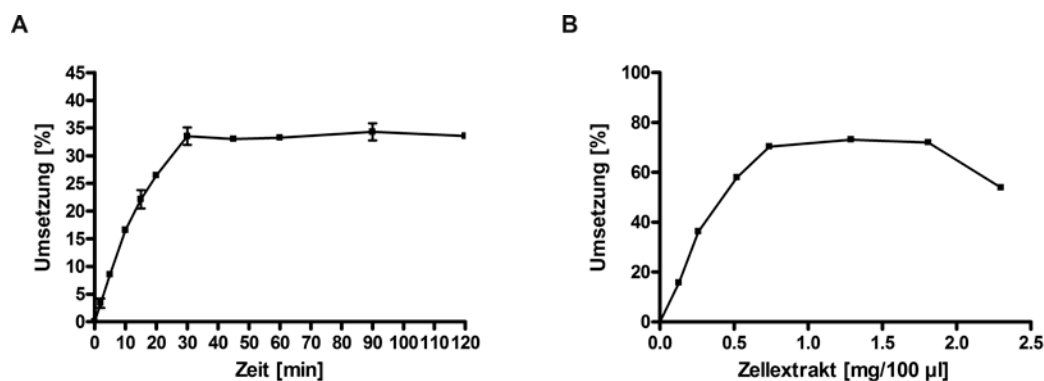


Abbildung 3-6: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von AuaA von A) der Inkubationsdauer in Anwesenheit von 1.3 mg Protein pro 100 µl Assay und B) der Proteinkonzentration nach einer Inkubation für 16 h.

3.2.7.2 Abhängigkeit der AuaA-Aktivität von Metallionen

Bekannte, charakterisierte membrangebundene Prenyltransferasen benötigen für ihre Aktivität divalente Metallionen wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} (Heide, 2009a). Aus diesem Grund wurde die Abhängigkeit der AuaA-Aktivität von der Anwesenheit von Metallionen untersucht (Abbildung 3-7). Ähnlich wie andere Prenyltransferasen weist AuaA eine strikte Abhängigkeit von Metallionen auf. Während in den Assays ohne Zusätze nur eine geringe Umsetzung von 0.5 % beobachtet werden konnte, führte die Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zu einem vollständigen Aktivitätsverlust. Verglichen mit der Umsetzung ohne Zusätze konnte durch die Zugabe von divalenten Metallionen eine deutliche Aktivitätssteigerung erzielt werden. So betrug die Umsetzung in Anwesenheit von Magnesium 6.9 %, was einer 14-fachen Aktivitätssteigerung entsprach. Eine Ähnliche Auswirkung auf die Enzymaktivität zeigten Mangan und Kobalt. Mit einer Umsetzung von 8.5 % in Anwesenheit von Mangan und von 7.3 % in Anwesenheit von Kobalt wurde eine 17- bzw. eine 15-fache Aktivitätssteigerung erreicht.

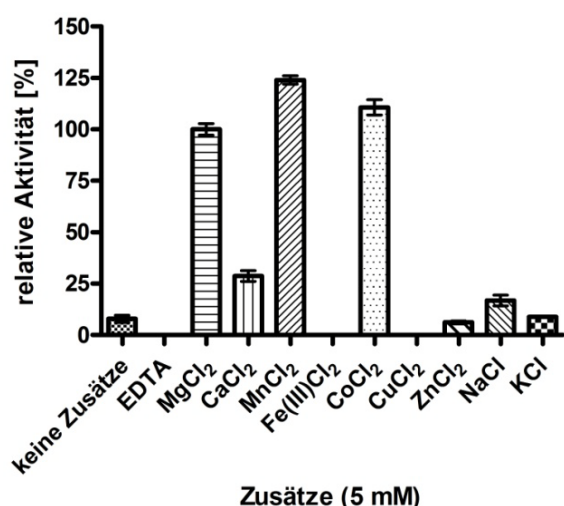


Abbildung 3-7: Ionenabhängigkeit der enzymatischen Aktivität von AuaA. Die mit Mg^{2+} beobachtete Aktivität (Umsatz von 6.9 %) wurde als 100 % definiert.

3.2.7.3 Substratspezifität von AuaA

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach Inkubation von AuaA in Anwesenheit von 2-Methyl-4-Hydroxychinolin und FPP Aurachin D als Produkt entstand, wurde zunächst die Akzeptanz der Farnesyltransferase gegenüber 15 weiteren Chinolinderivaten getestet. Dafür wurden Aktivitätsassays für 10 min bzw. 16 h in Anwesenheit von FPP inkubiert (2.7.7.1) und mittels HPLC analysiert (Abbildung 3-8).

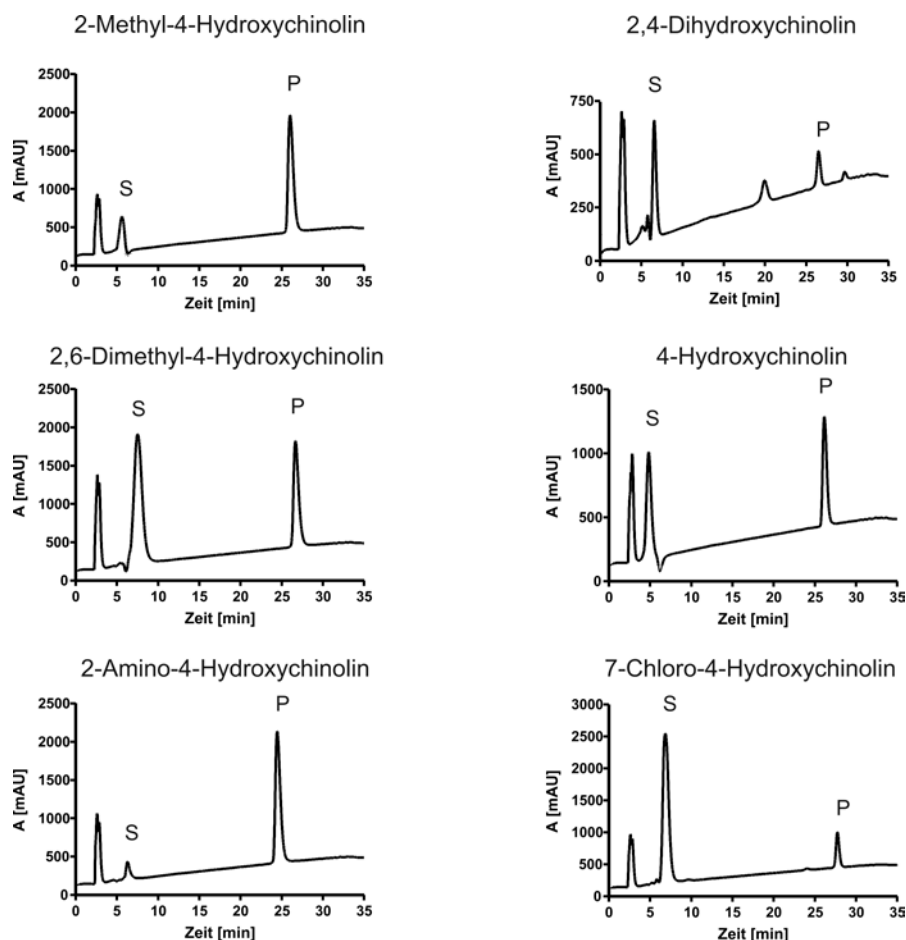


Abbildung 3-8: HPLC-Chromatogramme der Assays zur Untersuchung der Substratspezifität von AuaA nach Inkubation für 16 h. Ausgewählt wurden die sechs am besten akzeptierten Substrate. Die Detektion erfolgte bei 240 nm. S: Substrat, P: Produkt.

AuaA akzeptierte neben 2-Methyl-4-Hydroxychinolin sechs der 16 getesteten Chinolinderivate (Tabelle 3-4), wobei alle akzeptierten Substanzen eine Hydroxyl (OH)-Gruppe an Position C4 des Chinolinrings trugen.

Substrate, die eine OH-Gruppe an einer anderen Position besitzen, z.B. an Position C2 wie 2-Hydroxy-4-Methylchinolin, C5 wie 5-Hydroxychinolin oder C8 wie 2-Methyl-8-Hydroxychinolin, konnten von AuaA sogar nach einer Inkubationsdauer von 16 h nicht umgesetzt werden.

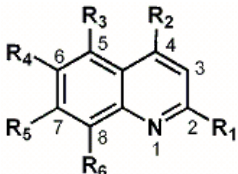
Als nichtakzeptierte Substrate erwiesen sich auch Substanzen, in denen die Hydroxylgruppe durch eine Amino- bzw. Methylgruppe substituiert wurde (2-Methyl-4-Aminochinolin und 2,4-Dimethylchinolin). Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass die OH-Gruppe an Position C4 des Chinolinringes für die Akzeptanz durch AuaA essentiell ist.

Im Gegensatz dazu scheint die Methylgruppe an Position C2 die Substratakzeptanz zu begünstigen, ist hierfür jedoch nicht essentiell. Im Vergleich zu 2-Methyl-4-Hydroxychinolin

betrug die relative Aktivität für 4-Hydroxychinolin 17 %. Die Substitution der Methylgruppe an Position C2 durch eine OH-Gruppe (2,4-Dihydroxychinolin) resultierte in einer stark reduzierten, aber dennoch detektierbaren Aktivität von 9 %. Ein gegensätzliches Ergebnis wurde nach Austausch der Methylgruppe durch eine Aminogruppe, wie bei 2-Amino-4-Hydroxychinolin, beobachtet. Während AuaA nach 10 min Inkubation mit diesem Substrat eine deutliche Aktivität von 66 % zeigte, konnte durch die Verlängerung der Inkubationsdauer auf 16 h sogar eine bessere Akzeptanz für dieses Substrat (126 %) als für das natürliche Substrat 2-Methyl-4-Hydroxychinolin erzielt werden.

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Substitutionen mit Methyl-, Chloro-, Fluoro- oder Trifluoromethylgruppen am zweiten Ring zu einer Reduktion der Aktivität bis zu einem vollständigem Aktivitätsverlust von AuaA führen können.

Tabelle 3-4: Akzeptanz verschiedener Chinolinderivate durch AuaA. Die Inkubation der Assays erfolgte für 10 min bzw. 16 h bei 30 °C. Die mit 2-Methyl-4-Hydroxychinolin als Substrat beobachtete Umsetzung (7.23 % nach 10 min und 71.64 % nach 16 h) wurde als 100 % definiert. nd: nicht bestimmt

Substrat	Struktur						relative Aktivität [%] nach Inkubation für	
							10 min	16 h
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆		
2-Methyl-4-Hydroxychinolin	CH ₃	OH	H	H	H	H	100.00 ± 5.81	100.00 ± 5.64
2,6-Dimethyl-4-Hydroxychinolin	CH ₃	OH	H	CH ₃	H	H	20.19 ± 1.24	47.60 ± 1.91
2-Amino-4-Hydroxychinolin	NH ₂	OH	H	H	H	H	65.93 ± 2.35	126.47 ± 1.93
2,4-Dihydroxychinolin	OH	OH	H	H	H	H	9.13 ± 0.69	22.51 ± 0.33
4-Hydroxychinolin	H	OH	H	H	H	H	17.15 ± 3.46	54.68 ± 2.81
4-Hydroxy-7-Chloroquinolin	H	OH	H	H	Cl	H	9.68 ± 0.97	16.67 ± 0.15
4-Hydroxy-8-Fluoroquinolin	H	OH	H	H	H	F	≤ 0.41	4.60 ± 0.28
2-Trifluoromethyl-4-Hydroxyquinolin	CF ₃	OH	H	H	H	H	n.d.	≤ 0,4
2-Carboxyl-4-Hydroxyquinolin	COOH	OH	H	H	H	H	n.d.	≤ 0,4
2-Methyl-4-Aminoquinolin	CH ₃	NH ₂	H	H	H	H	n.d.	≤ 0,4
2-Methyl-8-Hydroxyquinolin	CH ₃	H	H	H	H	OH	n.d.	≤ 0,4
2-Hydroxy-4-Methylquinolin	OH	CH ₃	H	H	H	H	n.d.	≤ 0,4
2,4-Dimethylquinolin	CH ₃	CH ₃	H	H	H	H	n.d.	≤ 0,4
2-Methyl-4-Chloroquinolin	CH ₃	Cl	H	H	H	H	n.d.	≤ 0,4
2-Methylquinolin	CH ₃	H	H	H	H	H	n.d.	≤ 0,4
5-Hydroxyquinolin	H	H	OH	H	H	H	n.d.	≤ 0,4

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Chinolinderivaten wurden 3-Hydroxyisochinolin und 6-Methylchromanon als mögliche Substrate für AuaA getestet. Für diese Substanzen konnte

keine Produktbildung nachgewiesen werden, was auf die Wichtigkeit der Chinolinstruktur für die Akzeptanz durch AuaA hindeuten könnte. Im Gegensatz dazu wurde das Substrat der membrangebundenen Prenyltransferase UbiA, 4-Hydroxybenzoesäure, von AuaA mit einer relativen Aktivität von 8 % im Vergleich zu 2-Methyl-4-Hydroxychinolin umgesetzt. Eine sehr geringe Produktbildung (bis max. 4.5 %) wurde ebenfalls mit einigen Hydroxynaphthalinen beobachtet.

AuaA enthält in seiner Aminosäuresequenz die konservierte Konsensussequenz KDlxDxEGD, die bisher als charakteristisch für Flavonoid- bzw. Homogenisat-Prenyltransferasen spekuliert wurde. Aus diesem Grund wurde die Akzeptanz einiger Flavonoide (Abbildung 3-9) durch AuaA in Anwesenheit von FPP, GPP oder DMAPP untersucht. In den HPLC-Chromatogrammen der mit Naringenin bzw. Phloretin durchgeführten Assays (2.7.7.1) konnte nur in Anwesenheit von FPP eine geringe Produktbildung von weniger als 1.5 % detektiert werden. Dagegen konnte keine Aktivität in den Assays mit Luteolin, Genistein oder Quercetin in Anwesenheit von FPP, GPP oder DMAPP beobachtet werden.

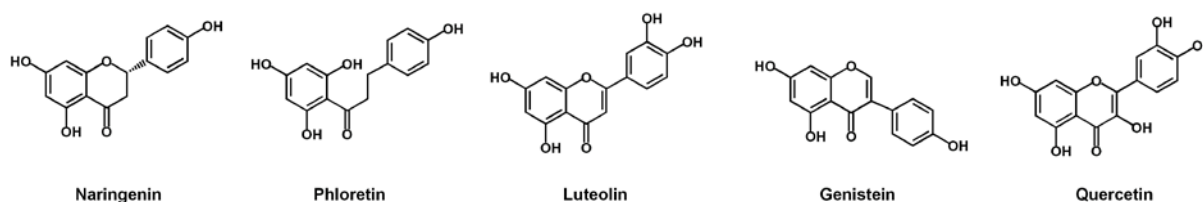


Abbildung 3-9: Chemische Strukturen der zur Untersuchung der Substratspezifität von AuaA eingesetzten Flavonoide.

Im Gegensatz zu der Flexibilität gegenüber den getesteten aromatischen Substraten, wies AuaA eine relativ hohe Spezifität in Bezug auf den Prenyldonor auf. In Anwesenheit des natürlichen Substrates 2-Methyl-4-Hydroxychinolin wurden Aktivitätsassays mit GPP als Prenyldonor durchgeführt und 16 h inkubiert. HPLC-Analyse zeigte, dass AuaA GPP nur mit einer relativen Aktivität von 3.3 % im Vergleich zu FPP akzeptierte.

3.2.7.4 Bestimmung der kinetischen Parameter

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden die vier von AuaA am besten akzeptierten Chinolinderivate ausgewählt. Die Assays (2.7.7.1) mit 2-Methyl-4-Hydroxychinolin, 2,6-Dimethyl-4-Hydroxychinolin, 4-Hydroxychinolin und 2-Amino-4-Hydroxychinolin wurden in Anwesenheit von FPP durchgeführt. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde FPP in der Endkonzentration von 0,5 mM eingesetzt, da

höhere Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit herabsetzten. Dieser Effekt wurde zuvor auch für die membrangebundene Prenyltransferase UbiA beobachtet.

Die Reaktionen folgten der Michaelis-Menten Kinetik (Originaldaten siehe Anhang, 6.4). Die Auswertung der Daten erfolgte nach Hanes-Woolf, Eadie Hofstee und Lineweaver-Burk, wobei die K_M - und V_{max} -Werte als Mittelwert aller drei Bestimmungen angegeben sind (Tabelle 3-5).

Der K_M -Wert für 2-Methyl-4-Hydroxychinolin betrug 0.27 ± 0.03 mM und für FPP 0.043 ± 0.002 mM. Etwas höhere K_M -Werte wurden für 2,6-Dimethyl-4-Hydroxychinolin und 4-Hydroxychinolin ermittelt. Der K_M -Wert von 2-Amino-4-Hydroxychinolin war mit 0.08 mM niedriger als der des natürlichen Substrates 2-Methyl-4-Hydroxychinolin.

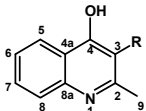
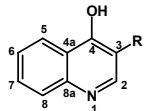
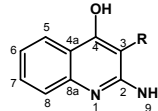
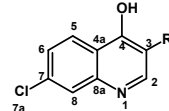
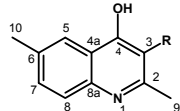
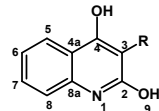
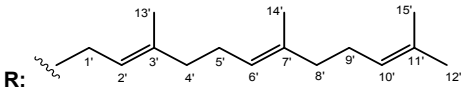
Tabelle 3-5: Kinetische Parameter von AuaA. Die Bestimmung der kinetischen Parameter für FPP erfolgte in Anwesenheit von 2 mM 2-Methyl-4-Hydroxychinolin und für Chinoline in Anwesenheit von 0.5 mM FPP. Angegeben sind die Mittelwerte nach Auswertung der Daten nach Hanes-Woolf, Eadie-Hofstee und Lineweaver-Burk.

Substrat	K_M [mM]	V_{max} [nmol/min•mg]
2-Methyl-4-Hydroxychinolin	0.27 ± 0.03	2.07 ± 0.01
2,6-Dimethyl-4-Hydroxychinolin	0.31 ± 0.09	0.31 ± 0.06
4-Hydroxychinolin	0.57 ± 0.25	0.77 ± 0.26
2-Amino-4-Hydroxychinolin	0.08 ± 0.01	1.14 ± 0.05
FPP	0.043 ± 0.002	2.35 ± 0.06

3.2.8 Identifizierung der enzymatischen Produkte von AuaA

Zum Nachweis der Farnesylierung durch AuaA und Aufklärung der Strukturen der enzymatischen Produkte wurden Assays mit sechs der am besten akzeptierten Substrate im größeren Maßstab durchgeführt 2.7.7.1. Die gebildeten Produkte wurden mittels HPLC isoliert (2.8.1.2) und $^1\text{H-NMR}$ - (Tabelle 3-6) und HR-EI-MS-Analysen (Tabelle 3-7) unterzogen.

Tabelle 3-6: ^1H -NMR-Daten der enzymatischen Produkte von AuaA in CDCl_3 . Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm, die Kopplungskonstanten J in Hz angegeben.

Isoliertes Produkt	2-Methyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	2-Amino-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	3-Farnesyl-4-Hydroxy-7-Chloroquinolin	2,6-Dimethyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	2,4-Dihydroxy-3-Farnesylchinolin
						
						
Proton	δ_{H} , multi, (J)	δ_{H} , multi, (J)	δ_{H} , multi, (J)	δ_{H} , multi, (J)	δ_{H} , multi, (J)	δ_{H} , multi, (J)
OH/NH	9.35, sbr	---	14.96, s	---	10.13, s	10.32, s
H-2	---	7.70, s	---	7.53, s ^[j]	---	---
H-5	7.39, d (8.0)	7.64, m	7.72, dbr (8.4)	7.38, d (8.5)	8.18, s	7.24, m*
H-6	7.52, tbr (7.7)	7.45, tbr (7.5)	7.39, tbr (7.7)	8.30, d (8.7)	---	7.24, m*
H-7	7.29, tbr (7.6)	7.64, m	7.64, tbr (7.7)	---	7.36 dd (8.5, 1.5)	7.52, tbr (7.7)
H-8	8.38, d (8.2)	8.36, d (8.6)	7.99, dbr (8.3)	7.76, s ^[j]	7.40, d (8.2)	7.89, d (8.3)
H-9	2.46, s	---	2.15, s	---	2.46, s ^[n]	3.49, s
H-10	---	---	---	---	2.42, s ^[n]	---
H-1'	3.41, d (6.7)	3.86, d (6.7)	3.31, d (7.1)	3.33, d (7.2)	3.38, d (6.5)	3.54, d (7.4)
H-2'	5.13, t (6.7)	5.19, t (7.3)	5.28, t (7.0)	5.34, tbr (7.3)	5.09, t (6.3)	5.44, t (7.1)
H-4'	1.92, m ^[a]	1.97, m ^[d]	1.99, m ^[g]	2.00, m ^[k]	1.91, m ^[o]	2.00, m ^[r]
H-5'	1.97, m ^[a]	2.06, m ^[d]	2.05, m ^[g]	2.06, m ^[k]	1.95, m ^[o]	2.06, m ^[r]
H-8'	2.04, m ^[a]	2.08, m ^[d]	2.15, m ^[g]	2.12, m ^[k]	2.01, m ^[o]	2.18, m ^[r]
H-9'	2.04, m ^[a]	2.11, m ^[d]	2.15, m ^[g]	2.12, m ^[k]	2.02, m ^[o]	2.18, m ^[r]
H-6'	5.05, tbr (6.9) ^[b]	5.10, tbr (6.9) ^[e]	5.08, m ^[h]	5.11, tbr (6.6) ^[i]	5.04, tbr (6.7) ^[p]	5.08, m ^[s]
H-10'	5.06, tbr (6.9) ^[b]	5.08, tbr (7.0) ^[e]	5.08, m ^[h]	5.01, tbr (8.1) ^[i]	5.04, tbr (6.7) ^[p]	5.08, m ^[s]
H-12'	1.65, s	1.66, s	1.66, s	1.68, s	1.65, s	1.67, s
H-13'	1.76, s	1.67, s	1.85, s	1.70, s	1.75, s	1.87, s
H-14'	1.56, s ^[c]	1.60, s ^[f]	1.61, s ^[i]	1.61, s ^[m]	1.55, s ^[q]	1.62, s ^[t]
H-15'	1.55, s ^[c]	1.58, s ^[f]	1.57, s ^[i]	1.59, s ^[m]	1.54, s ^[q]	1.58, s ^[t]

^[a-t] Die Zuordnung der Signale mit gleichen Buchstaben ist austauschbar. * Signale überlappen mit denen des Lösungsmittels.

In dem ^1H -NMR Spektrum, das für das enzymatische Produkt der AuaA-Reaktion in Anwesenheit von 2-Methyl-4-Hydroxychinolin und FPP erhalten wurde (Abbildung 6-17), konnte eindeutig der Verlust eines aromatischen Protons (H-3) beobachtet werden. Einige Signale dagegen deuteten auf das Vorhandensein eines Farnesylrests hin. Zum Beispiel konnten vier Singulette in dem Bereich von 1.55-1.76 ppm den vier Methylgruppen zugeordnet werden, während drei Triplette bei 5.13, 5.05 und 5.06 ppm für Protonen H-2', H-6' und H-10' detektiert wurden. Durch das Duplett bei 3.41 ppm für H-1' konnte die C-Prenylierung bestätigt werden (Unsöld & Li, 2005). Ein Vergleich der erhaltenen Daten mit den für Aurachin D publizierten chemischen Verschiebungen (Augustiniak *et al.*, 1986) bestätigte, dass es sich bei dem isolierten enzymatische Produkt um Aurachin D handelt.

Mit Hilfe der ^1H -NMR- und der HR-EI-MS-Analyse konnte AuaA als aromatische Farnesyltransferase identifiziert werden, die die Prenylierung von 2-Methyl-4-Hydroxychinolin in Anwesenheit von FPP katalysiert, wobei Aurachin D entsteht.

In allen anderen Spektren der isolierten enzymatischen Produkte (Originaldaten siehe Anhang, 6.5) konnten ebenfalls Signale für einen Farnesylrest beobachtet werden. Einen Nachweis für die Prenylierung der Substrate an Position C3 des Chinolinringes lieferte der Vergleich der für die enzymatischen Produkte erhaltenen Spektren mit denen des jeweiligen nicht prenylierten Substrates. Eine zusätzliche Bestätigung der Anwesenheit einer Farnesylgruppe in den isolierten Produkten konnte mittels einer HR-EI-MS-Analyse erzielt werden (Tabelle 3-7, für Originaldaten siehe 6.5).

Tabelle 3-7: HR-EI-MS Daten der enzymatischen Produkte von AuaA.

Produkt	chemische Formel	HR-EI-MS (M^+)		Abweichung (ppm)
		berechnet	gemessen	
2-Methyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	$\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{NO}$	363.2562	363.2582	-5.5
3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}$	349.2406	349.2395	3.0
2-Amino-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}$	364.2515	364.2502	3.4
3-Farnesyl-4-Hydroxy-7-Chlorochinolin	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NOCl}$	383.2016 / 385.1986	383.1998 / 385.2007	4.6 -2.1
2,6-Dimethyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin	$\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{NO}$	377.2719	377.2747	-7.6
2,4-Dihydroxy-3-Farnesylchinolin	$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{NO}_2$	365.2355	365.2359	-1.1

3.2.9 Zielgerichtete Mutagenese von AuaA

3.2.9.1 Sequenzanalyse und Erzeugung von Mutationen

Wie zuvor erwähnt, enthält AuaA wie andere charakterisierte membrangebundene Prenyltransferasen zwei aspartatreiche Motive in der Aminosäuresequenz (Abbildung 3-2). Diese Motive sollen mit Hilfe von divalenten Metallionen die Koordination von Substraten im aktiven Zentrum vermitteln.

Während der Charakterisierung von AuaA wurden zwei weitere membrangebundene Prenyltransferasen publiziert. Dabei handelte es sich um SfiLDT und SfG6DT aus *S. flavescens*, die als Chalcon- bzw. Isoflavon-spezifische Prenyltransferasen charakterisiert werden konnten (Sasaki *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wurde eine Aktualisierung des zuvor durchgeführten multiplen Sequenzvergleichs (Abbildung 3-10) vorgenommen, welche neben SfiLDT und SfG6DT eine weitere Prenyltransferase, GmG4DT, enthielt. Letztere wurde in *Glycine max* identifiziert, wo sie die Schlüsselreaktion in der Biosynthese der Glyceolline katalysiert (Akashi *et al.*, 2009). Eine genaue Betrachtung der beiden aspartatreichen Motive zeigte, dass mit Ausnahme von AuaA alle Sequenzen einen hochkonservierten Asparaginrest (N) in Motiv I enthalten, auf welchen entweder eine negativ geladene Aminosäure wie Asparaginsäure (D) bzw. Glutaminsäure (E) oder die neutrale Aminosäure Glutamin (Q) folgen. Diese Aminosäurereste sind häufig an der Koordination von Substraten durch Magnesium beteiligt. Die Sequenz von AuaA weist dagegen als einzige eine basische Aminosäure an dieser Stelle auf (Arginin 53).

		Motiv I			Motiv II	
SaAuaA	49	ELT NR YA D R I EDAV	62	173	SGIKDIT D VEG D AKRGYRSF	192
SfN8DT	170	VGL N QLCD I ED I DKI	183	303	ALFKDIP D MEG D EKFQISL	322
GmG4DT	169	CGV N QLY D LEID I DKI	182	302	ALSKDIP D VEG D KEHGIDSF	321
SfG6DT	167	CGF N QLCD I ED I DKI	180	300	ALFKDIP D TEG D KKFGIRSL	319
SfiLDT	151	CGL N ELCD V EL I DKI	164	284	ALFKDIP D IEG D KKFGVQSL	303
AtHPT	153	VGL N QLSD V EID I DKV	166	286	ALFKDIP D IEG D KIFGIRSF	305
LePGT1	80	CTI N DYF D RNF D KK	93	201	DTIYAHQ D KV D DAKAGIKST	220
EcUbiA	64	CVV N DYAD R KF D GH	77	184	DTQYAMV D R D DD V KIGIKST	203
EcMenA	61	NLAN D YGD A VKGSD	74	197	LNINNLR D INS D RENGKNTL	216
ScCoq2	139	CTI N DFL D RK L DQR	152	259	DTIYAHQ D KK F DIKAGIKST	278
OsPPT1c	191	CTV N DLL D RD I DNK	204	312	DTIYAHQ D KED D LKVGKST	331

Abbildung 3-10: Konservierte aspartatreiche Motive in AuaA und einigen charakterisierten membrangebundenen Prenyltransferasen aus verschiedenen Organismen. Für zielgerichtete Mutageneseexperimente ausgewählte Aminosäuren sind eingerahmt, die für Flavonoid- bzw. Homogenisat-Prenyltransferasen charakteristische Sequenz ist grau markiert. SaAuaA (AM404078) ist aus *Stigmatella aurantiaca*; SfN8DT (BAG12671), SfG6DT (AB604224) und SfiLDT (AB604223) aus *Sophora flavescens*, Gm4DT aus (BAH22520) aus *Glycine max*, AtHPT (NP849984) aus *Arabidopsis thaliana*, LePGT1 (BAB84122) aus *Lithospermum erythrorhizon*, EcUbiA (Accession No. BAB38446) und EcMenA (U56082) aus *Escherichia coli*; ScCoq2 (P32378) aus *Saccharomyces cerevisiae* und OsPPT1c (BAE96574) aus *Oryza sativa*.

Da es nicht auszuschließen war, dass dieser Argininrest in die direkte Bindung des Diphosphates involviert ist, wie es bei den Prenyltransferasen der DMATS-Familie (Metzger *et al.*, 2009; Stec *et al.*, 2008) oder bei einigen löslichen bakteriellen Prenyltransferasen (Kuzuyama *et al.*, 2005; Metzger *et al.*, 2010) beschrieben ist, wurde die Bedeutung dieser Aminosäure mittels zielgerichteter Mutagenese untersucht. Zusätzlich zu R53 wurde auch der Einfluss von konservierten Aminosäuren in Motiven I und II auf die enzymatische Aktivität untersucht. Durch Austausch einzelner Basen in der DNA-Sequenz nach der Methode von Zheng *et al.*, 2004 (2.6.7.2) wurden insgesamt elf Derivate von AuaA erzeugt (Tabelle 3-8).

Tabelle 3-8: Mittels zielgerichteter Mutagenese erzeugte Derivate von AuaA. Die ausgetauschten Basen sind unterstrichen.

Mutation	Basenaustausch	Expressionskonstrukt
N52D	<u>A</u> AT → <u>G</u> AT	pES44
N52A	<u>A</u> AT → <u>G</u> CT	pES45
R53A	<u>C</u> GC → <u>G</u> CC	pES46
D56N	<u>G</u> AT → <u>A</u> AT	pES47
D56A	<u>G</u> AT → <u>G</u> CT	pES48
D60N	<u>G</u> AC → <u>A</u> AC	pES49
D60A	<u>G</u> AC → <u>G</u> CC	pES50
D180N	<u>G</u> AC → <u>A</u> AC	pES51
D180A	<u>G</u> AC → <u>G</u> CC	pES52
D184N	<u>G</u> AC → <u>A</u> AC	pES53
D184A	<u>G</u> AC → <u>G</u> CC	pES54

Als *template* wurde das AuaA-Expressionskonstrukt pES19 eingesetzt, die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-8 aufgelistet. Nachdem die Einführung der Mutationen in den erhaltenen Plasmiden durch Sequenzierung bestätigt wurde, erfolgte die Überproduktion der mutierten Proteine in *E. coli* M15-Zellen unter den für Wildtyp-AuaA beschriebenen Bedingungen (2.6.9.1).

3.2.9.2 Versuche zur Solubilisierung von AuaA

Da die Überproduktion von Wildtyp-AuaA nicht mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte (3.2.4), sollte die Produktion der mutierten His₆-Proteine anhand eines Western Blots (2.7.5) der isolierten Membranfraktionen mit anschließender Immunofärbung überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst Versuche zur Solubilisierung der Membranfraktion aus *E. coli* M15 durchgeführt, die das AuaA-Expressionskonstrukt (pES19) trugen. Als Negativkontrolle dienten *E. coli* M15-Zellen mit dem leeren pQE60-Vektor. Triton X-100, Triton X-114, SDS und N-Laurylsarcosin wurden in der Endkonzentration von 2 % als

Detergenzien eingesetzt und mit der jeweiligen Membranfraktion (5mg/ml) für 16 h bei 4 °C inkubiert. Eine anschließende Western Blot-Analyse der mit verschiedenen Detergenzien behandelten Membranfraktionen zeigte, dass das beste Ergebnis mit N-Laurylsarcosin erzielt werden konnte (Abbildung 3-11, Spur 6). Aus diesem Grund wurde dieses Detergens für spätere Solubilisierungen von Membranfraktionen verwendet.

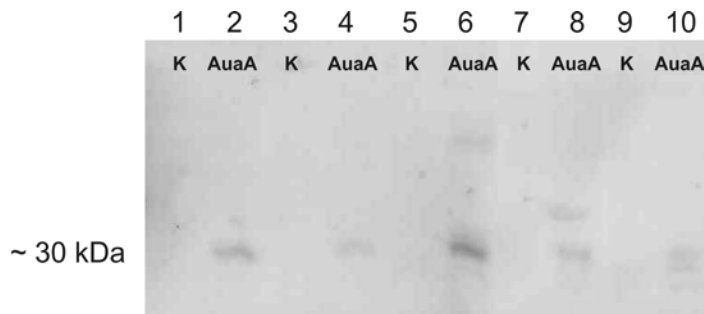


Abbildung 3-11: Western Blot von AuaA nach Behandlung der Membranfraktion mit verschiedenen Detergenzien. Als Negativkontrolle (K) wurde die Membranfraktion von *E. coli* M15 mit dem leeren pQE60-Vektor verwendet. Membranfraktionen mit je 50 µg Gesamtprotein wurden mit 2 % des jeweiligen Detergens für 16 h bei 4 °C inkubiert. 1 und 2: Triton X-100, 3 und 4: Triton X-114, 5 und 6: N-Laurylsarcosin, 7 und 8: Natriumdodecylsulfat, 9 und 10: ohne Zusätze.

3.2.9.3 Überproduktion von mutierten AuaA-Derivaten

Die Überproduktion der mutierten AuaA-Derivate in *E. coli* M15 wurde anhand eines Western Blots überprüft (Abbildung 3-12). Der Blot bestätigte die Produktion von zehn der elf mutierten Proteine in *E. coli* M15, wobei für D180A kein Signal detektiert werden konnte. Die Mutation D180A schien die Proteinproduktion negativ zu beeinflussen, ähnlich wie nach Mutation einiger Asparaginsäurereste in LePGT1 beobachtet wurde (Ohara *et al.*, 2009).

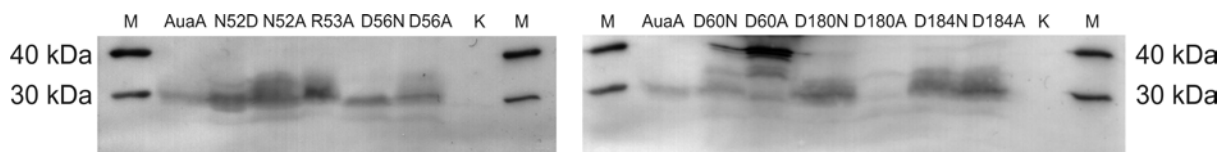


Abbildung 3-12: Western Blot zur Überprüfung der Überproduktion von AuaA und mutierten Derivaten. Die Proteine wurden in *E. coli* M15 [pREP] Zellen produziert. Nach Membranisolierung durch Ultrazentrifugation wurden die Membranfraktionen durch Inkubation mit 2 % N-Laurylsarcosin für 16 h bei 4 °C solubilisiert. Zur Immunodetektion wurde eine SDS-PAGE mit jeweils 50 µl der solubilisierten Membran durchgeführt und anschließend einem Western Blot unterzogen.

Im Vergleich zu Wildtyp-AuaA war die Überproduktion einiger der mutierten Derivate, z.B. N52D, N52A, R53A, D180N, D184N und D184A höher. Sowohl AuaA als auch die mutierten Proteine zeigten eine Größe von ca. 30 kDa und weichen somit von dem errechneten Molekulargewicht von 37.5 kDa ab. Dieser Unterschied könnte durch die Anwesenheit des

Detergens N-Laurylsarcosin nach Solubilisierung der Membranfraktionen entstanden sein. Des Weiteren wurden in den Spuren von D60N und D60A zusätzliche Signale bei ca. 35 und 40 kDa detektiert. Die Ursache für das Auftreten mehrerer Banden in diesen beiden Proben blieb unklar.

3.2.9.4 Bestimmung der Aktivität von AuaA und mutierten Derivaten

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der mutierten Derivate von AuaA wurden Assays mit den natürlichen Substraten 2-Methyl-4-Hydroxychinolin und FPP durchgeführt (2.7.7.1). Die Ergebnisse der HPLC-Analyse der Assays sind in Tabelle 3-9 zusammengefasst. Nach einer Inkubationsdauer von 16 h wurde für Wildtyp-AuaA eine Umsetzung von 71.7 % beobachtet. Der Austausch der Asparaginsäurereste führte unter denselben Bedingungen in allen Fällen zum vollständigen Verlust der Enzymaktivität und zeigte damit ihre Bedeutung für die Aktivität von AuaA. Auch nach dem Austausch von N52 konnte keine Farnesyltransferaseaktivität mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führte der Austausch von R53 nicht zu dem erwarteten Ergebnis. Für das mutierte Derivat AuaA_R53A konnte eine Umsetzung von 37 % beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der 3-fach höheren Konzentration von R53A in der Membranfraktion im Vergleich zu AuaA (Abbildung 3-12 und Tabelle 3-9) wurde für R53A eine relative Aktivität von 17.1 % berechnet, was darauf schließen lässt, dass dieser Aminosäurerest nicht essentiell für die enzymatische Reaktion ist.

Tabelle 3-9: Enzymaktivität von AuaA und mutierten Derivaten. Die für Wildtyp-AuaA beobachtete Umsetzung wurde als 100 % definiert. nd: nicht detektierbar

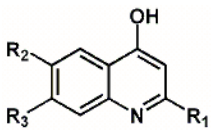
Mutation in	Enzym	Umsetzung [%]
	AuaA	71.7 ± 2.4
Motiv I	N52D	nd
	N52A	nd
	R53A	37.0 ± 0.7 ^a
	D56N	nd
	D56A	nd
	D60N	nd
	D60A	nd
Motiv II	D180N	nd
	D180A	keine Genexpression
	D184N	nd
	D184A	nd

^a Durch einen Vergleich der Signalintensitäten im Western Blot (Abbildung 3-12) wurde die Konzentration von R53A in der Membranfraktion drei Mal so hoch geschätzt wie von Wildtyp-AuaA. Unter Berücksichtigung der höheren Überproduktion wurde eine relative Aktivität des Mutanten R53A von 17.1 % im Vergleich zum Wildtypenzym berechnet

3.2.9.5 Substratspezifität des mutierten Enzyms AuaA_R53A

Das mutierte Protein AuaA_R53A wurde, wie zuvor Wildtyp-AuaA, auf seine Substratspezifität hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde es mit den sechs Chinolinderivaten inkubiert, die von dem nicht mutierten AuaA am besten akzeptiert wurden. Die HPLC-Analyse der Assays (2.7.7.1) zeigte, dass alle der sechs getesteten Chinolinderivate auch von AuaA_R53A umgesetzt werden. Verglichen mit Wildtyp-AuaA bevorzugt AuaA_R53A jedoch andere Chinolinderivate. Zum Beispiel wird 2-Amino-4-Hydroxychinolin von dem mutierten Protein 3-fach besser akzeptiert als von Wildtyp-AuaA, welches das natürliche Substrat 2-Methyl-4-Hydroxychinolin präferiert. Auch 4-Hydroxychinolin wird von AuaA_R53A besser umgesetzt als das natürliche Substrat, während das nicht mutierte Enzym eine relative Aktivität von nur 17 % nach der Inkubation mit diesem Substrat aufweist.

Tabelle 3-10: Akzeptanz ausgewählter Chinolinderivate durch AuaA_R53A in Anwesenheit von FPP. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei 30 °C. Die für das natürliche Substrat 2-Methyl-4-Hydroxychinolin beobachtete Umsetzung wurde als 100 % definiert.

Substrat	Struktur			AuaA_R53A		Wildtyp-AuaA*	
				Umsetzung [%]	relative Aktivität [%]	Umsetzung [%]	relative Aktivität [%]
	R ₁	R ₂	R ₃				
2-Methyl-4-Hydroxychinolin	CH ₃	H	H	5.1 ± 0.2	100.0 ± 3.9	7.2 ± 0.4	100.0 ± 5.8
2,6-Dimethyl-4-Hydroxychinolin	CH ₃	CH ₃	H	1.5 ± 0.2	29.5 ± 3.5	1.5 ± 0.1	20.2 ± 1.2
2-Amino-4-Hydroxychinolin	NH ₂	H	H	17.1 ± 0.0	334.6 ± 0.0	4.5 ± 0.2	65.9 ± 2.3
2,4-Dihydroxychinolin	OH	H	H	4.3 ± 0.9	83.7 ± 17.4	0.7 ± 0.1	9.1 ± 0.7
4-Hydroxychinolin	H	H	H	6.0 ± 0.2	117.6 ± 4.5	1.2 ± 0.2	17.1 ± 3.7
4-Hydroxy-7-Chloroquinolin	H	H	Cl	1.10 ± 0.0	21.5 ± 0.2	0.7 ± 0.1	9.7 ± 1.0

* Die Daten wurden aus vorherigen Untersuchungen übernommen (3.2.7.3)

Bei den Untersuchungen zur Substratspezifität von AuaA_R53A wurde das Enzym analog zu Wildtyp-AuaA auch mit Flavonoiden in Anwesenheit von FPP, GPP sowie DMAPP inkubiert. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse waren mit denen für AuaA vergleichbar (3.2.7.3). Die sehr niedrige Umsetzung von nur zwei der sechs getesteten Flavonoide lässt sich durch die

generell breite Substratspezifität der aromatischen Prenyltransferasen erklären und ist wahrscheinlich nicht auf die spezielle Präferenz gegenüber Flavonoiden aufgrund der Anwesenheit des KDIxDxEGD-Motivs zurückzuführen. Aus diesem Grund sollte die Relevanz dieses Motivs für Flavonoid- und Homogenisat-Prenyltransferasen überprüft werden.

3.2.9.6 Bestimmung der kinetischen Parameter für AuaA_R53A

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA_R53A wurde der entsalzte Zellextrakt (2.7.1.2) mit dem natürlichen Substrat 2-Methyl-4-Hydroxychinolin in Anwesenheit von FPP inkubiert. Die von AuaA_R53A katalysierten Reaktionen folgten wie das Wildtyp-Enzym der Michaelis-Menten-Kinetik (Anhang, 6.6). Die Auswertung der Daten erfolgte nach Hanes-Woolf, Eadie Hofstee und Lineweaver-Burk. Die K_M -Werte sind als Mittelwert der drei Bestimmungen angegeben. Für 2-Methyl-4-Hydroxychinolin wurde ein K_M -Wert von 0.38 mM und für FPP von 0.039 mM ermittelt. Diese Werte stimmten mit den für Wildtyp-AuaA bestimmten K_M -Werten von 0.27 mM für das aromatische Substrat und 0.043 mM für FPP überein.

3.3 Zielgerichtete Mutagenese von 7-DMATS, FgaPT2 und FtmPT1 zur Identifizierung der am Prenyltransfer beteiligten Aminosäuren

3.3.1 Einleitung

Aromatische Prenyltransferasen weisen unterschiedliche Mechanismen bei dem Transfer des Prenylrests auf das Akzeptormolekül auf. Der Prenylrest kann mit Hilfe von divalenten Metallionen im aktiven Zentrum koordiniert werden, wie bei *trans*-Prenyltransferasen und bei membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen (Liang, 2009; Ohara *et al.*, 2009). Wie die Strukturanalyse der löslichen Prenyltransferase NphB gezeigt hat, können nicht nur Metallionen, sondern auch basische Aminosäurereste eine wichtige Rolle bei der Erkennung des Prenyldiphosphates spielen (Kuzuyama *et al.*, 2005). Zu damaligem Zeitpunkt ließen bioinformatisch erstellte Modelle weiterer Enzyme der NphB/CloQ-Gruppe vermuten, dass in magnesiumunabhängigen Enzymen wie z.B. CloQ und Fnq26 die Koordination des Seitenkettensubstrates direkt von basischen Aminosäuren vermittelt wird (Tello *et al.*, 2008). Da die Aktivität aromatischer Prenyltransferasen der DMATS-Familie aus Pilzen ebenfalls von der Anwesenheit von Metallionen unabhängig ist (Li, 2009; Steffan *et al.*, 2009), sollte untersucht werden, ob hier ebenso die positiv geladenen Aminosäuren in die Bindung des Prenyldiphosphats involviert sind.

3.3.2 Sequenzanalyse und Einführung der Mutationen

Um mögliche Aminosäurereste zu identifizieren, die an der Bindung des Prenyldonors DMAPP beteiligt sein könnten, wurden zunächst die Aminosäuresequenzen von sieben charakterisierten Prenyltransferasen der DMATS-Familie (FgaPT1, FgaPT2, FtmPT1, 7-DMATS und CdpNPT aus *A. fumigatus*, TdiB aus *A. nidulans* und DmaW aus *C. purpurea*) analysiert. Diese wiesen Sequenzidentitäten zwischen 20 und 55 % auf der Aminosäureebene auf (Tabelle 1-1).

Die Aminosäuresequenzen dieser Prenyltransferasen wurden verglichen und obwohl sie keine stark konservierten Regionen enthielten, konnten zwei Motive mit hochkonservierten basischen Aminosäureresten identifiziert werden (Abbildung 3-13). In jedem der beiden Motive befand sich jeweils ein Lysinrest, wobei Motiv B zusätzlich dazu einen Argininrest aufwies, welcher nur eine Aminosäure von dem Lysin entfernt vorlag.

CdpNPT	1	-----MDGEMTASPPDIS-----ACDTSAVDEQTGSGSQSQAIPKDIAYHTLTALKLLFPDIDQYQ--HWHHVAPMLAK	67
FtmPT1	1	-----MPPAPPDQK-----PCHQ-----LQPAPYRALSESILFGSVDEER--WWHSTAPILSR	46
FgaPT1	1	----MTKTDAGRHPQET-----ATHAATTDEEVQD-----QWRAPFEVLRSRTLVFQHEDHRL--WWERAASKLAT	60
FgaPT2	1	-----MK-----AANA-----SSAEAYRVLSRAFRFNDQKL--WWHSTAPMFAK	39
TdiB	1	-----MATEYWSRHLRSVLAP	16
DmaW	1	-----MS-----TAKD-----PGNGVYEILSLIFDFPSNEQRL--WWHSTAPMFAA	39
7-DMATS	1	MSIGAEIDSLVPAPPGLNGTAAGYPAKTQKELSNQDGFDAHDGLSLAQLTPYDVLTAALPLPAPASSTGFWWRETGPVMSK	80
CdpNPT	68	MLVDGK-YSIHQQYEYLCFLAQLVAPVLGPYP--SPGR-----DVYRCTLGGNMTVELSQNFQSRG-----STTRIAFEP	134
FtmPT1	47	LLISSN-YDVDVQYKLSLYRHLVLPALGPYP--QRDPETGIATQWRSGMVLTLGLPIEFSNNVAR-----ALIRIGVDP	118
FgaPT1	61	YLRLAK-YSVGSQYQHLLMFYSVYAPNLGPWP--NDKRD---NVHWWCGICPGGENLEISMNYQQG--AKCTVRIAAET	131
FgaPT2	40	MLETAN-YTTPCQYQYLITYKECVIPSLGCYP--TNS-----APRWLSILTRYGTFELSLNCSN-----SIVRYTFEP	105
TdiB	17	LFAAAGTYSPEQESHAFIDEHIAPNLGLPLWEPHG-----PYSTPSSLVGSFPDPSINIVSS--GKAKVRDFDFV	86
DmaW	40	MLDNAG-YNIHDQYRHLGIFKKHIIPFLGVYP--TKD-----KERWLSILTRCGLPLELSLNCTD-----SVVRYTYEP	105
7-DMATS	81	LLAKAN-YPLYTHYKYLMLYHTHILPLLGRPPLENSTHPSNAPWRSFLLTDDFTPLEPSWNVNGNSEAQSTIRLGIEP	159
CdpNPT	135	VRYQASVGHDRFNRTSVNAFFSQLQLLVKSVNIELHLLHLLSEHLTLTAKDERNLNEEQLTXYLTNFQVKTQYVVALDLRK-	213
FtmPT1	119	VTADSGTAQDPFNTTRPKVYLETAARLLPGVDLTRFYEFETELVITKAEAEVLQ---ANPDLFRSPWKSQILTAMDQKS	195
FgaPT1	132	ITPAAGTDKDPFNLTAEKKMIEDLKALQPNLNTWFNHFQREVLVPEEVALN-----NDEIISKVPFKNQRLHGLDLSE-	205
FgaPT2	106	INQHTGTDKDPFNTHAIWESLQHLPLEKSIDLEWFRHFKHDLTLNSEESAFLA---HNDRLVGGTIRTQNKLALDLKD-	181
TdiB	87	ISPPDRTPGDPFAEGSAREILHRLADLVG-ADTQWMGYLMDALYLTPAEAEVAK-----TKLPPGVAIPPSSVGFDFDG-	159
DmaW	106	INEVTGTGKDTFNTLAIMTSVQKLAQIQAGIDLEWFSYFKDELTLDESESATLQ---SNE-LVKEQIKTQNKLALDLKE-	180
7-DMATS	160	IGFEAGAAADPFNQAAVTQFMHSYEATEVGATLTLFEHFRNDMFVGPETYAALR-----AKIPEGEHTTQSFLAFDLDA-	233
Motiv A			
CdpNPT	214	TGIYAK EYFFPGIKCAATG TGSNACFGAIRAVDK-DGHLDSLCLIEAHFQQSK-----	267
FtmPT1	196	GTVLV KAYFFPQPKSAVTGH STEDLLVNAIRKVDR-EGRFETQLANLQRYIERRRRGLHVPVGTADKPPATAADKAFDAC	274
FgaPT1	206	GAF LKSYFMPAIRSAITG VENTQIMFESIRKLNLNANFISALSTLEDWMVPTNGRFMEYWDG-----	269
FgaPT2	182	GRF LKTYIYPALKAVVTG TIHELTVGSVRRLLAVREPRILPPLNMLEEYIRSR-----GSKSTAS-----	242
TdiB	160	PER LKFYIPSVRKALATG QVSELMKLTGLGLQPLGSELVPAMDLIASYLSTRNDAMLPLVG-----	223
DmaW	181	SQF LKVFYFPHLKSIAATG STHDLIFDSVLKLSQKHDSIQPAFQVLCDYVSRNRHSAEVDQHGHALH-----	247
7-DMATS	234	GRV LKAYFFPILMSLKTG STTKVVSDSLHLALKSEVWGVQTIAAMSVMCAWIGSYGGAAKT-----	297
Motiv B			
CdpNPT	267	-IDDAFL CDL VDP PAHTRFKVY IADPLVTLARAEHHTLGGRLTDEDAAVGLEIIRGLWSELGIIQG-PLPSAMMEKG-	344
FtmPT1	275	SFFPHF STDLVEPGKSRV KFYASERHVNLMQVEDIWTFGGLRRDPDALRGLELLRHFWADIQMRGYYTMRPGFCELGK	354
FgaPT1	269	----- SYDAVDACARIKIYT GIRMKSEIHARDVWTLGGRLQGEDIEKGFDLVARLWRRLMDEEPSTCEMKYWMQWV-	342
FgaPT2	242	---PRL SCDL TS PAKSRIKIY LLEQMVSLEAMEDLWTLGGRRRDASTLEGLSLVRELWDLIQLSPGLKSYAPYLPPLG-	318
TdiB	223	----- IICDL PRTHKN ARVKCYL HTSSNSFAVVRDVLTLGGRLSDDTSLKRVETLKSVMPLLINELEGPQSDAATMDES	298
DmaW	247	---AR LSCDL ID PAKSRIKIY LLEKTVLSVMEDLWTLGGQRVDASTMDGLDMLRELWSLLKVPTGHLEYPKGYLELG-	323
7-DMATS	297	-----EM SVDCVNEADSRIKIY VRMPHTSLRKVKEAYCLGGRLTDENTKEGLKLLDELWRTVFGIDDEDAELPQNSHRT-	372
CdpNPT	344	-----LLPIMLNMYEMKAGQ-RLPKPKLYMPL--TGIPETKIARIMTAFFQRHD-MPEQAEVFMENLQAYYEGKNL	410
FtmPT1	354	-----SSAGFEAPMMFHFHLDGSQSPFPDPQMYVCV--FGMNSRKLVEGLTTFYRRVG-WEEMASHYQANFLANYPDEDF	426
FgaPT1	342	-----WELRTDV-PFPVPKLYFSV--AAADHYVSDTVVEILDYLG-WDDLQVTHRALMDEAWSLGQT	401
FgaPT2	318	-----VIPDERLPLMANFTLHQND-PVPEQVYFTT--FGMNDMAVADALTTFFERRG-WSEMARTYETTLKSYYPHADH	389
TdiB	299	SKPERLNRTGYSIGIYTIETPGQ-AIPDTKIYVPLFQYTDSEVAERNFESALKKLGNWGLSGKYRSVMQEIFK----	373
DmaW	323	-----EIPNEQLPSMANYTLHHND-PMPEPQVYFTV--FGMNDAEISNALTIFQRHG-FDDMAKNYRVFLQDSYPYHDF	394
7-DMATS	372	-----AGTIFNFELRPGK-WFPEPKVYLPVRHYCESDMQIASRLQTFFGRLG-WHNMEKDYCKHLEDLFPHHPL	439
CdpNPT	411	EEATRYQAWLSFAYTKEKGPYLSIYFWPE-----	440
FtmPT1	427	EKAHLCAYVSFAYKN-GGAYVTLYNHSFNP-----VGDVSPFN-----	464
FgaPT1	402	TKSYLAFSYISVTFHSIKGPYITTYGNPSGPRPVF-----	436
FgaPT2	390	DKLNYLHAYISFSYRD-RTPYLSVYLQSFETGDWAVANLSESKVKCQDAACQPTALPPDLSTKGVYYSGLH	459
TdiB	374	DVENYQGTYASFSYTEGKGVYTTSYVAMPIKDEGGVSLAGDFGFRN-----	419
DmaW	395	ESLNYLHAYISFSYRR-NKPYSVYLHTFETGRNPVF--ADSPISFD--AYRRCELSTK-----	448
7-DMATS	440	SSSTGTHTFLSFSYKKQKGVYMTMYNLRVYST-----	472

Abbildung 3-13: Vergleich der Aminosäuresequenzen einiger Prenyltransferasen der DMATS-Familie. Alle Sequenzen enthalten zwei Motive (schwarz eingerahmt) mit hochkonservierten basischen Aminosäuren (rot), welche in die Erkennung von DMAPP involviert sein könnten. Die für Mutageneseexperimente ausgewählten Aminosäuren sind grau, die als Negativkontrolle verwendete Asparaginsäure ist blau markiert. CdpNPT (ABR14712), FtmPT1 (AAX56314), FgaPT1 (XP_756136), FgaPT2 (AAX08549) und 7-DMATS (ABS89001) sind aus *Aspergillus fumigatus*, TdiB (ABU51603) aus *Aspergillus nidulans* und DmaW-Cp (Q6X2E0) aus *Claviceps purpurea*.

Um die Bedeutung dieser Aminosäurereste für die katalytische Aktivität pilzlicher Prenyltransferasen der DMATS-Familie zu untersuchen, wurden die Enzyme FgaPT2, FtmPT1 und 7-DMATS für Mutageneseversuche ausgewählt. Es erfolgte ein Austausch der basischen durch saure bzw. neutrale Aminosäuren, wobei die Lysinreste durch Glutaminsäure und der Argininrest durch Glycin ersetzt wurden. Als Negativkontrolle wurde Asparaginsäure, eine hochkonservierte saure Aminosäure in Motiv B, verwendet. Da diese Aminosäure negativ geladen war, sollte sie nicht direkt in die Erkennung des Prenyldiphosphates involviert sein. Dieser Asparaginsäurerest wurde zu Histidin mutiert. Als Positivkontrollen dienten die nicht mutierten Prenyltransferasen FgaPT2, FtmPT1 und 7-DMATS. Als Ergebnis der Mutagenese wurden von jeder der drei Prenyltransferasen jeweils vier mutierte Derivate erzeugt. Diese sind in Tabelle 3-11 zusammengefasst.

Tabelle 3-11: Übersicht über den Austausch ausgewählter Aminosäurereste in FgaPT2, FtmPT1 und 7-DMATS. Die ausgetauschten Basen sind unterstrichen.

Enzym	Mutation	Basenaustausch 5'	Expressionskonstrukt
FgaPT2	K187E	<u>A</u> AG → <u>G</u> AG	pES1
	R257G	<u>A</u> GA → <u>G</u> GA	pES2
	K259E	<u>A</u> AG → <u>G</u> AG	pES3
	D249H	<u>G</u> AT → <u>C</u> AT	pES4
FtmPT1	K201E	<u>A</u> AG → <u>G</u> AG	pES5
	R292G	<u>C</u> GG → <u>G</u> GG	pES6
	K294E	<u>A</u> AG → <u>G</u> AG	pES7
	D284H	<u>G</u> AC → <u>C</u> AC	pES8
7-DMATS	K239E	<u>A</u> AG → <u>G</u> AG	pES9
	R311G	<u>C</u> GG → <u>G</u> GG	pES10
	K313E	<u>A</u> AG → <u>G</u> AG	pES11
	D303H	<u>G</u> AT → <u>C</u> AT	pES12

Nach Einführung der gewünschten Mutationen mit Hilfe des QuikChange™ *Site directed mutagenesis* Kits (2.6.7.2) erfolgte die Überprüfung der erhaltenen Plasmide durch Sequenzierung. Anschließend wurden die Plasmide zur Expression der mutierten Gene für die Transformation von *E. coli* XL1 blue MRF' verwendet.

3.3.3 Überproduktion und Aufreinigung der mutierten Proteine mit anschließender Bestimmung ihrer Aktivität

FgaPT2 und seine mutierten Derivate wurden in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS überproduziert und FtmPT1, 7-DMATS sowie ihre Derivate in *E. coli* XL1 blue MRF. Die Bedingungen zur Überproduktion entsprachen denen für die nicht mutierten Enzyme (Grundmann & Li, 2005; Kremer *et al.*, 2007; Steffan *et al.*, 2007).

Die Überproduktion und Aufreinigung (2.7.3) der Proteine sowie die Durchführung von Aktivitätsassays (2.7.7.2) erfolgte für FgaPT2 und mutierte Derivate durch Frau Dr. N. Steffan, für FtmPT1 durch Herrn Dr. H.-X. Zou und für 7-DMATS durch Frau Dr. A. Kremer.

Mit Ausnahme der Negativkontrolle für FgaPT2, FgaPT2_D249H, konnten alle Proteine überproduziert und ihre Aktivitäten bestimmt werden.

Durch HPLC-Analyse der Assays (Abbildung 3-14) konnte für die Wildtypenzyme folgende Umsetzung beobachtet werden: 21.2 % für FgaPT2, 10.6 % für FtmPT1 und 9.9 % für 7-DMATS (Tabelle 3-12). Derivate aller drei Prenyltransferasen, in welchen der Lysinrest in Motiv B durch Glutaminsäure ausgetauscht wurde (FgaPT2_K259E, FtmPT1_K294E und 7-DMATS_K313E), zeigten dagegen keine detektierbare Aktivität. In den Assays mit mutierten Derivaten von FtmPT1 und 7-DMATS, in welchen der Lysinrest aus Motiv A durch Glutaminsäure ersetzt wurde (FtmPT1_K201E und 7-DMATS_K239E), konnte ebenfalls keine Produktbildung beobachtet werden. Nur das entsprechende Derivat von FgaPT2 (FgaPT2_K187E) zeigte noch eine sehr geringe Aktivität von 2.8 % im Vergleich zu Wildtyp-FgaPT2. Der Austausch der Argininreste durch Glycin in FtmPT1 und 7-DMATS hatte dagegen weniger Einfluss auf die enzymatische Aktivität dieser Prenyltransferasen, da die relative Aktivität von FtmPT1_R292G nur um etwa 50 % gesenkt wurde und 7-DMATS_R311G noch eine Restaktivität von 36.7 % im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym aufwies. Die entsprechende Substitution R257G in FgaPT2 führte dagegen zu einem hohen Aktivitätsverlust von ca. 95 %.

Wie erwartet, hatte die Mutation des konservierten, sauren Asparaginsäurerests keinen großen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Prenyltransferasen. Im Vergleich zu den nicht mutierten Enzymen konnte für FtmPT2_D284H eine relative Aktivität von 33 % und für 7-DMATS von 42.5 % bestimmt werden.

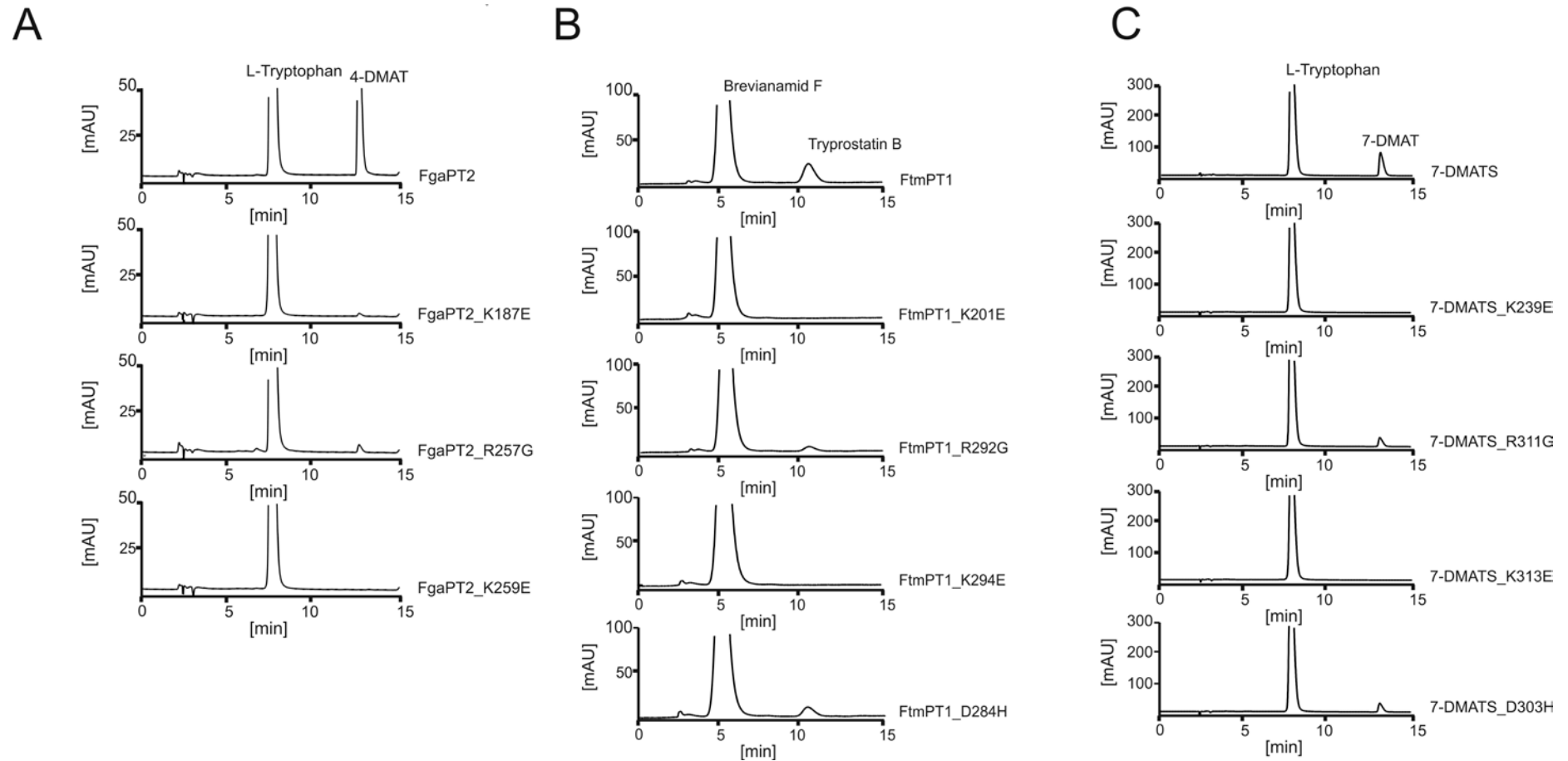


Abbildung 3-14: HPLC-Chromatogramme der Aktivitätsassays mit A) FgaPT2 und seinen mutierten Derivaten, B) FtmPT1 und seinen mutierten Derivaten und C) 7-DMATS und seinen mutierten Derivaten. Die Detektion erfolgte bei 277 nm.

Tabelle 3-12: Aktivitäten von FgaPT2, FtmPT1, 7-DMATS und ihren mutierten Derivaten. Die für das jeweilige Wildtyp-Enzym beobachtete Umsetzung wurde als 100 % definiert.

FgaPT2 und Derivate	Umsetzung [%]	relative Aktivität [%]	FtmPT1 und Derivate	Umsetzung [%]	relative Aktivität [%]	7-DMATS und Derivate	Umsetzung [%]	relative Aktivität [%]
FgaPT2	21.19±2.18	100±10.3	FtmPT1	10.62±1.03	100±9.7	7-DMATS	9.85±1.23	100±12.5
K187E	0.6 ^[a]	2.8	K201E	≤ 0.05	≤ 0.6	K239E	≤ 0.03	≤ 0.3
R257G	1.00±0.21	4.7±1.0	R292G	5.12±0.36	48.2±3.4	R311G	3.61±0.22	36.7±2.3
K259E	≤ 0.04	≤ 0.2	K294E	≤ 0.05	≤ 0.6	K313E	≤ 0.03	≤ 0.3
			D284H	3.50±0.29	33.0±2.8	D303H	4.19±0.30	42.5±3.0

^[a] Produktbildung wurde nur in einem der Reaktionsansätze detektiert

3.4 Zielgerichtete Mutagenese zur Unterstützung der Strukturaufklärung von FgaPT2

3.4.1 Einleitung

In Kooperation mit Prof. Heide und Prof. Stehle aus Tübingen wurde die Kristallstruktur der 4-Dimethylallyltryptophansynthase FgaPT2 aufgeklärt (Metzger *et al.*, 2009). Basierend auf den daraus gewonnenen Informationen über das aktive Zentrum des Enzyms (Abbildung 3-15) wurde ein Reaktionsmechanismus (Abbildung 3-16) postuliert, der für den von FgaPT2 regiospezifisch an Position C4 des Indolrings katalysierten Prenyltransfer verantwortlich ist.

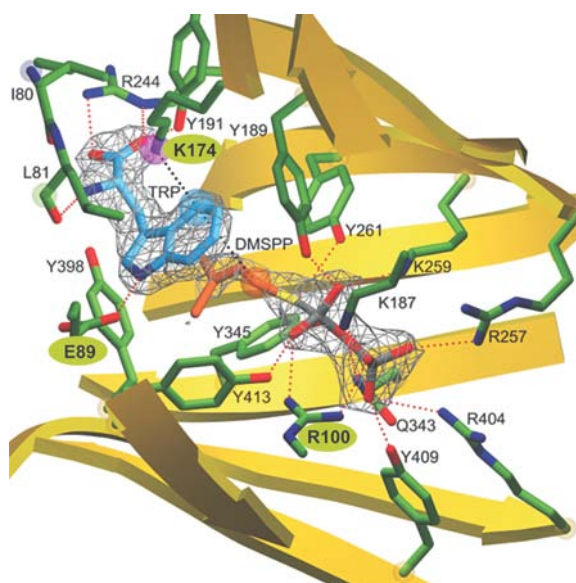


Abbildung 3-15: Aktives Zentrum von FgaPT2 (Metzger *et al.*, 2009). Aminosäurereste, die zur Unterstützung der Strukturaufklärung mutiert wurden, sind grün markiert.

Bei dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus spielen zwei der im aktiven Zentrum lokalisierten Aminosäurereste (E89 und K174) eine Schlüsselrolle. Durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylgruppe der Seitenkette von E89 und dem NH des Indols soll die Reaktivität des Indolrings für eine elektrophile Substitution durch das aus DMAPP gebildete Carbeniumion begünstigt werden. Gleichzeitig soll die Aminogruppe von K174 das Proton an C4 abstrahieren und so die Substitution durch den Prenylrest ermöglichen.

Eine weitere Aminosäure, R100, sollte das negativ geladene Prenyldiphosphat von DMAPP im aktiven Zentrum koordinieren und somit für die Unabhängigkeit der Reaktion von divalenten Metallionen verantwortlich sein. Zum Nachweis dieser Hypothese wurden Mutationsversuche mit den drei oben genannten Aminosäureresten durchgeführt.

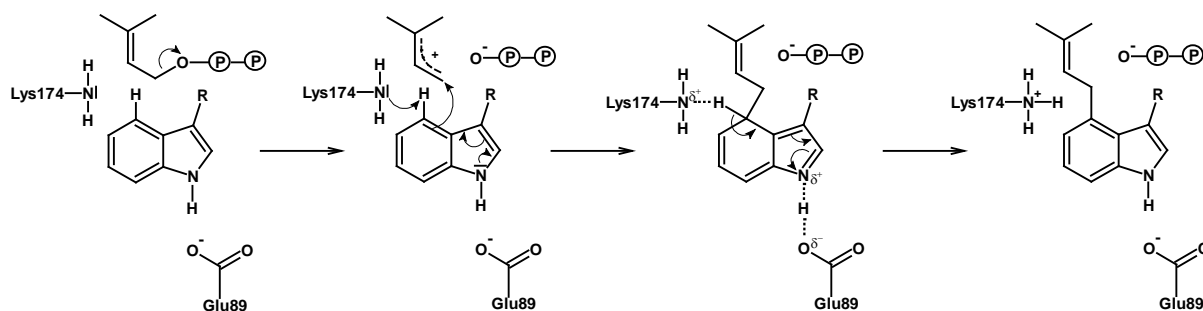


Abbildung 3-16: Postulierter Reaktionsmechanismus für die FgaPT2-Reaktion (Metzger *et al.*, 2009).

3.4.2 Herstellung mutierter Derivate von FgaPT2

Unter Anwendung der QuikChange™ Methode (2.6.7.2) wurden insgesamt fünf Mutationen erzeugt: E89A, R100D, R100Q, K174E und K174Q (Tabelle 3-13). Die erhaltenen Plasmide wurden sequenziert (2.6.8) und nach Bestätigung der gewünschten Mutationen für die Transformation (2.6.6.2) des Expressionsstammes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS eingesetzt.

Tabelle 3-13: Mittels zielgerichteter Mutagenese erzeugte Derivate von FgaPT2. Die ausgetauschten Basen sind unterstrichen.

Mutation	Basenaustausch	Expressionskonstrukt
E89 → A	<u>G</u> AA → <u>G</u> CA	pES20
R100 → D	<u>A</u> GA → <u>G</u> AT	pES21
R100 → Q	<u>A</u> GA → <u>C</u> AA	pES22
K174 → E	<u>A</u> AG → <u>G</u> AG	pES23
K174 → Q	<u>A</u> AG → <u>C</u> AG	pES24

3.4.3 Proteinüberproduktion und Aufreinigung

Die mutierten His₈-Proteine wurden unter den zuvor für FgaPT2 beschriebenen Bedingungen (Steffan *et al.*, 2007) überproduziert und anschließend unter Anwendung von Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus der löslichen Proteinfraction isoliert (2.7.2, 2.7.3). Als Positivkontrolle wurde nicht mutiertes FgaPT2 eingesetzt. Eine Analyse der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE zeigte, dass sowohl die Größe der mutierten Proteine (56 kDa) als auch ihre Überproduktion mit denen von FgaPT2 vergleichbar waren (Abbildung 3-17).

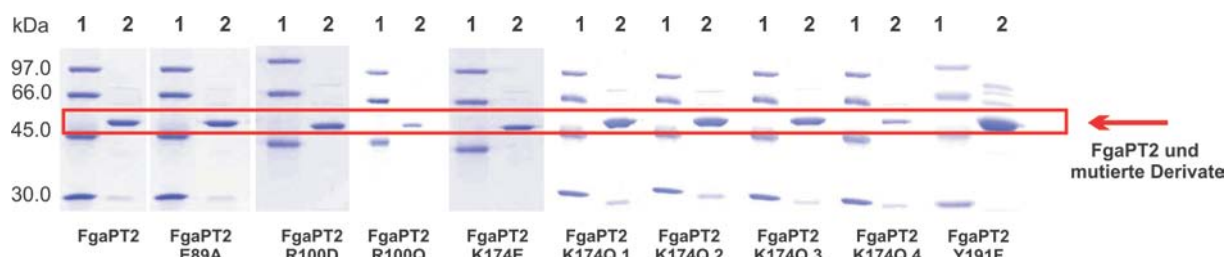


Abbildung 3-17: SDS-PAGE nach Aufreinigung von His₈-FgaPT2 und mutierten Derivaten. Erwartete Größe der Proteine betrug 56 kDa. 1: Proteingrößenstandard, 2: gereinigtes Protein.

3.4.4 Bestimmung der Aktivität der mutierten FgaPT2-Derivate

Um den Einfluss der Mutationen auf die enzymatische Aktivität von FgaPT2 zu untersuchen, wurden mit den gereinigten Proteinen Assays unter den zuvor für FgaPT2 beschriebenen Standardbedingungen (2.7.7.2) durchgeführt. Nach einer Inkubation der Reaktionsgemische für 60 min bei 30 °C zeigte Wildtyp-FgaPT2 eine Umsetzung von 17.3 % (Tabelle 3-14). Nach Austausch von E89 durch Alanin konnte keine Aktivität mehr detektiert werden, was die zentrale Rolle dieser Aminosäure in der FgaPT2-Reaktion bestätigt. Die Mutationen R100D und R100Q führten zu einem deutlichen Aktivitätsverlust von 94.8 und 99.6 %, wodurch die Wichtigkeit dieser Aminosäure für die Koordination des Prenyldiphosphates ebenfalls bestätigt wurde. Die Mutation von Lysin 174 zu einem negativ geladenen Glutaminsäurerest resultierte in einer relativen Aktivität von 2.3 %. Im Gegensatz dazu konnte nach der Substitution von K174 durch Glutamin keine deutliche Aktivitätsreduktion beobachtet werden. Da dieses Ergebnis im Widerspruch zu dem vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus stand, wurde das Protein aus insgesamt vier Klonen mit derselben Mutation isoliert (FgaPT2_K174Q.1-4) und auf Aktivität getestet. Im Durchschnitt zeigten die vier Enzyme einen mäßigen Aktivitätsverlust von 60.3 %.

Tabelle 3-14: Aktivitäten von FgaPT2 und mutierten Derivaten. Die für Wildtyp-FgaPT2 beobachtete Umsetzung wurde als 100 % definiert.

Enzym	absolute Aktivität [%]	relative Aktivität [%]
FgaPT2	17.3 ± 1.6	100.0 ± 9.2
FgaPT2_E89A	≤ 0.04	≤ 0.2
FgaPT2_R100D	0.9 ± 0.1	5.2 ± 0.6
FgaPT2_R100Q	0.07 ± 0.01	0.4 ± 0.1
FgaPT2_K174E	0.4 ± 0.1	2.3 ± 0.6
FgaPT2_K174Q*	6.9 ± 1.1 *	39.7 ± 6.2

* angegeben ist der Mittelwert der Aktivitäten von vier unabhängigen Mutanten (FgaPT2_K174Q.1-4)

Da die Mutation K174Q nicht zu dem erwarteten Ergebnis der vollständigen Inaktivierung der Enzymaktivität geführt hatte, wurde eine weitere Aminosäure vorgeschlagen (Y191), die sich in der Nähe von K174 im aktiven Zentrum von FgaPT2 befindet (Abbildung 3-17) und anstatt K174 eine zentrale Rolle in der von FgaPT2 katalysierten Reaktion spielen könnte. Um das zu überprüfen wurde diese Aminosäure zu Phenylalanin mutiert. Nachdem das mutierte Protein FgaPT2_Y191F in *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen produziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt wurde (Abbildung 3-17), erfolgte die Bestimmung seiner enzymatischen Aktivität. Dafür wurde ein Assay, wie oben für die anderen mutierten Proteine beschreiben, durchgeführt. Die HPLC-Analyse zeigte, dass die Mutation Y191F die Aktivität nicht negativ beeinflusst hat und das mutierte Enzym im Vergleich zu Wildtyp-FgaPT2 sogar eine leicht erhöhte Aktivität von 128.6 % aufwies. Damit konnte die essentielle Bedeutung dieses Aminosäurerests ausgeschlossen werden.

3.5 Produktion diprenylierter Indolderivate mit Hilfe von zwei rekombinanten Dimethylallyltryptophansynthasen FgaPT2 und 7-DMATS

3.5.1 Einleitung

Pilzliche Prenyltransferasen der DMATS-Familie zeigen eine hohe Spezifität gegenüber ihrem Prenyldonor, indem sie nur in Anwesenheit von DMAPP Aktivität aufweisen. Andererseits besitzen diese Enzyme eine relativ hohe Flexibilität in Bezug auf ihre aromatischen Substrate, weswegen sie sich gut als Werkzeuge zur chemoenzymatischen Synthese von prenylierten Substanzen eignen (Li, 2010; Steffan *et al.*, 2009). Produktion von monoprenylierten Indolderivaten wurde anhand einiger Enzyme dieser Gruppe demonstriert. Unter Einsatz von FgaPT2 wurden 17 regiospezifisch an Position C4 des Indolrings prenylierte, einfache Indolderivate mit Modifikationen sowohl am Indolring als auch in der Seitenkette hergestellt (Steffan *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte auch die Prenylierung von zyklischen Dipeptiden durch dieses Enzym nachgewiesen werden (Steffan & Li, 2009). Durch Inkubation mit 7-DMATS konnten sogar mehr als 20 regiospezifisch an Position C7 prenylierte, einfache Indolderivate produziert werden (Kremer & Li, 2008). Neueste Untersuchungen haben ergeben, dass dieses Enzym auch einige Naphthalinderivate und Flavonoide prenyliert (Yu *et al.*, 2011; Yu & Li, 2011b).

Monoprenylierte Indolderivate konnten darüber hinaus durch den Einsatz einiger weiterer Prenyltransferasen der DMATS-Familie hergestellt werden, z.B. der Dimethylallyltryptophansynthase 5-DMATS und der Dipeptid-Prenyltransferasen FtmPT1 und CdpNPT. Ähnlich wie FgaPT2 und 7-DMATS akzeptierte 5-DMATS eine Reihe einfacher Tryptophanderivate (Yu *et al.*, 2012), während FtmPT1 und CdpNPT Akzeptanz gegenüber zyklischen Dipeptiden aber auch einfachen Tryptophanderivaten gezeigt haben. (Grundmann & Li, 2005; Yin *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2009).

Die hohe Flexibilität dieser Enzyme gegenüber ihren aromatischen Substraten führte zu dem Versuch, diprenylierte Indolderivate durch Tandeminkubation von zwei Prenyltransferasen herzustellen (Abbildung 3-18). Zu diesem Zweck wurden FgaPT2 und 7-DMATS ausgewählt, da sie ein ähnliches Substratspektrum aufweisen und ihre Übernacht-Inkubationen mit acht Substraten in einer hohen Umsetzung von 32.5-99.7 % mit FgaPT2 und von 55.9-99.7 % mit 7-DMATS resultierten.

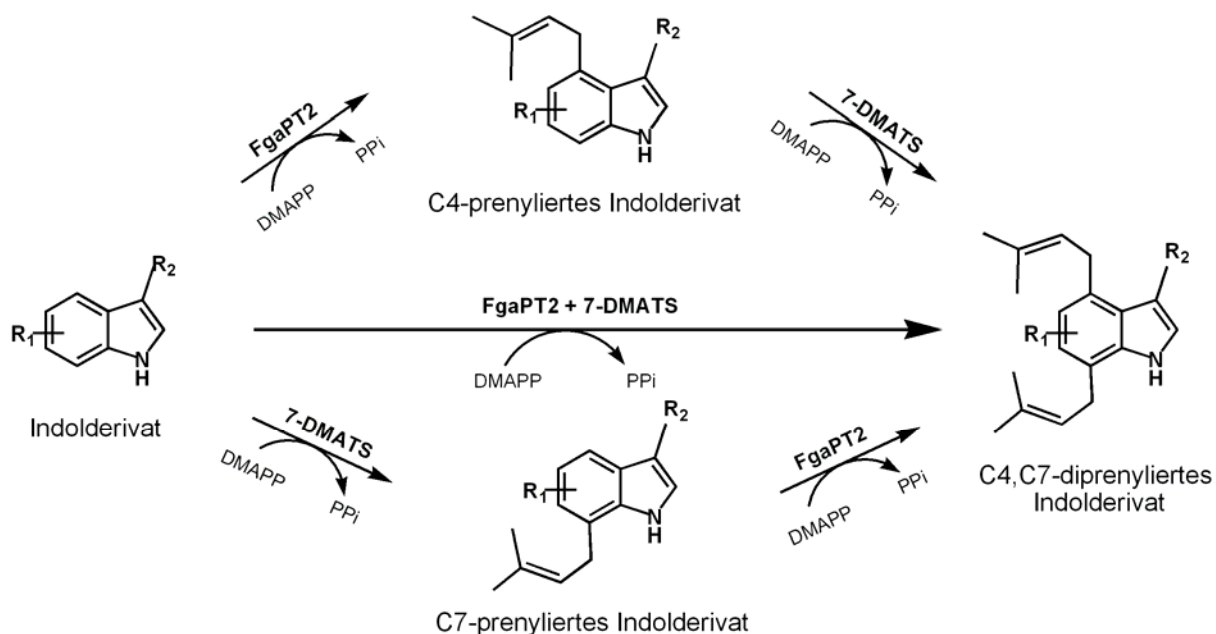


Abbildung 3-18: Schema der möglichen Synthese von diprenylierten einfachen Indolderivaten durch Inkubation mit rekombinanten Prenyltransferasen FgaPT2 und 7-DMATS.

3.5.2 Vorversuche zur Herstellung diprenylierter Indolderivate und Analyse der enzymatischen Produkte

In einem Vorversuch wurden die drei am besten von FgaPT2 und 7-DMATS akzeptierten Substrate, L-Tryptophan, L-Abrin und L- β -Homotryptophan, nacheinander mit beiden Prenyltransferasen inkubiert (2.7.7.3). Da FgaPT2 in vorherigen Untersuchungen eine geringere Flexibilität gegenüber den getesteten Substraten gezeigt hatte als 7-DMATS, wurde es als erstes Enzym bei der Tandeminkubation eingesetzt. Wie in Abbildung 3-19 zu sehen ist, konnte in allen Assays nach Inkubation mit FgaPT2 eine nahezu vollständige Umsetzung des jeweiligen Substrates zu einem 4-monoprenylierten Produkt beobachtet werden, was vorherige Untersuchungen bestätigte (Steffan *et al.*, 2007).

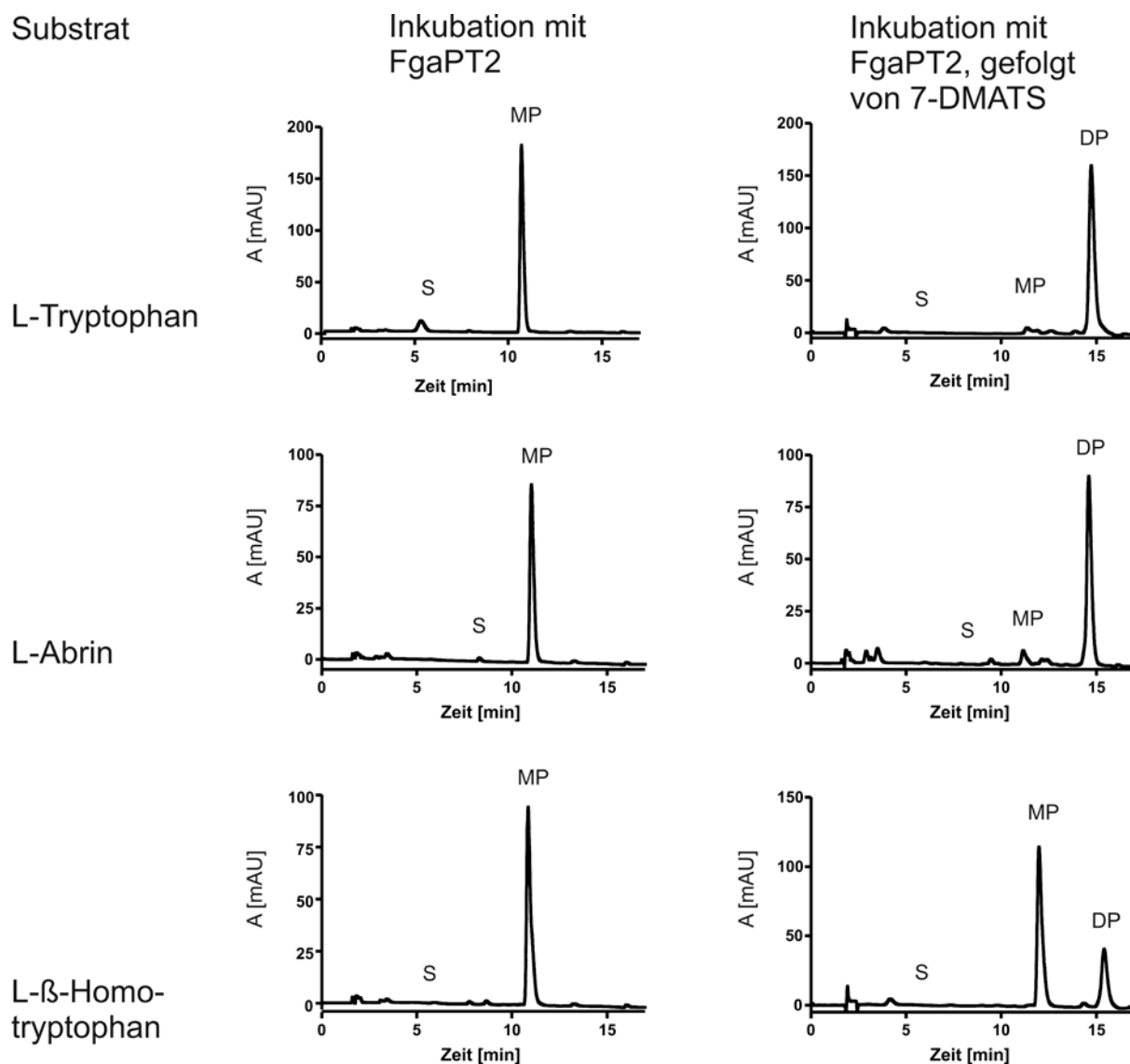


Abbildung 3-19: HPLC-Chromatogramme nach Inkubation von L-Tryptophan, L-Abrin und L-β-Homotryptophan mit FgaPT2 und anschließend mit 7-DMATS. S: Substrat, MP: C4-monoprenyliertes Produkt, DP: C4,C7-diprenyliertes Produkt.

Nach anschließender Inkubation der Assays mit L-Tryptophan bzw. L-Abrin in Anwesenheit von 7-DMATS wurden etwa 90 % des FgaPT2-Produkts weiter umgesetzt, während in dem Assay mit L-β-Homotryptophan etwa 30 % des monoprenylierten Produkts weiter umgesetzt wurden. Bei allen Endprodukten konnte durch LC-MS-Analyse (2.8.2.2) die Präsenz von zwei Prenylresten bestätigt werden (Tabelle 3-15, Originaldaten siehe Anhang, 6.7). Die in den Chromatogrammen detektierten Massen stimmten sehr gut mit den für die diprenylierten Indolderivate berechneten Massen überein.

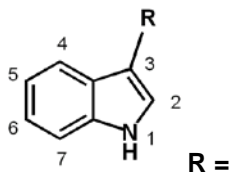
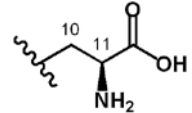
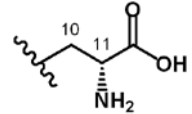
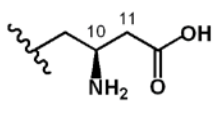
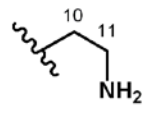
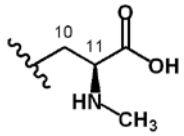
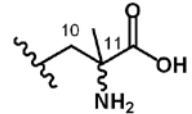
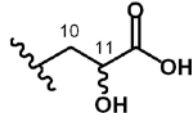
Tabelle 3-15: MS-Daten der enzymatischen Produkte nach Tandeminkubation mit FgaPT2 und 7-DMATS.

Produkt	Mr	ESI (+) m/z			ESI (-) m/z	
		$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	ms^2 von $[M+H]^+$ (rel. Intensität)	$[M-H]^-$	ms^2 von $[M-H]^-$ (rel. Intensität)
Di-(DMA)-L-Tryptophan	340.46	341.07	-	252.2 (21)	339.16	198.1 (27), 254.1 (11), 256.2 (6), 266.1 (8), 267.0 (5), 268.1 (24), 273.1 (7), 278.2 (10), 279.1 (8), 280.1 (10), 285.1 (20), 297.0 (26), 305.3 (6), 306.2 (15), 311.2 (60), 322.2 (7), 323.3 (12), 324.2 (14)
Di-(DMA)-L-Abrin	354.49	355.16	377.2	252.2 (26)	353.21	198.2 (9), 268.2 (50), 287.1 (21), 299.1 (16),
Di-(DMA)-L- β -Homotryptophan	354.49	355.15	377.2	292.2 (6), 309.3 (26), 354.3 (7)	353.21	214.1 (11), 226.1 (9), 240.1 (53), 252.2 (8), 254.2 (8), 268.3 (15), 269.2 (8), 270.1 (90)

3.5.3 Bestimmung der Substratspezifität und der Reihenfolge der Reaktionen

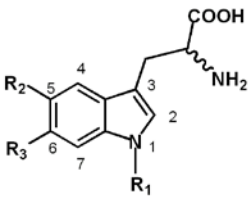
Für die effektive Herstellung verschiedener diprenylierter Indolderivate wurden zunächst zwei Reaktionsbedingungen überprüft. Zum einen wurde die Akzeptanz der Prenyltransferasen FgaPT2 und 7-DMATS gegenüber monoprenylierten Substanzen und zum anderen der Einfluss der Reaktionsreihenfolge in der Tandeminkubation auf die Produktausbeute untersucht. Zu diesem Zweck erfolgten Tandeminkubationen mit sieben ausgewählten einfachen Indolderivaten mit Modifikationen in der Seitenkette (Tabelle 3-16) und drei Indolderivaten, welche Modifikationen am Indolring trugen (Tabelle 3-17). Die ausgewählten Substrate wurden zuvor sowohl von FgaPT2 als auch von 7-DMATS akzeptiert (Kremer & Li, 2008; Steffan *et al.*, 2007). Die Assays wurden in Anwesenheit von DMAPP entweder mit FgaPT2 und anschließend mit 7-DMATS oder in umgekehrter Reihenfolge der Enzyme inkubiert (2.7.7.3). Die in Tabelle 3-17 zusammengefassten Ergebnisse der HPLC-Analyse zeigten, dass die Bildung von diprenylierten Produkten mit allen Substraten und mit beiden Kombinationen der Enzyme erreicht werden konnte. Die besten Resultate wurden jedoch erzielt, wenn für die erste Reaktion FgaPT2 eingesetzt und anschließend 7-DMATS zugegeben wurde. So wurde zum Beispiel für L-Abrin und L-Tryptophan eine Umsetzung von 92.7 % und 89.7 % zu dem entsprechenden diprenylierten Produkt beobachtet, während nur 11.3 % bzw. 20.0 % bei veränderter Enzymreihenfolge umgesetzt wurden.

Tabelle 3-16: Umsetzung von Tryptophanderivaten mit Modifikationen in der Seitenkette durch Tandeminkubationen mit FgaPT2 und 7-DMATS bei der Produktion von diprenylierten Indolderivaten.

Substrat	 R =	Umsetzung [%] abhängig von der Reaktionsreihenfolge	
		FgaPT2/7-DMATS	7-DMATS/FgaPT2
L-Tryptophan		89.7 ± 6.5	20.0 ± 1.3
D-Tryptophan		4.3 ± 1.0	2.6 ± 0.6
L-β-Homotryptophan		31.5 ± 0	6.6 ± 0.8
Tryptamin		11.0 ± 0.4	6.3 ± 1.4
L-Abrin		92.7 ± 1.3	11.3 ± 1.9
11-Methyl-DL-Tryptophan		33.5 ± 0.3	4.8 ± 0.5
DL-Indol-3-Milchsäure		35.7 ± 0.8	16.7 ± 0.1

Diese Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass 7-DMATS eine breitere Substratspezifität besitzt (Kremer & Li, 2008) und somit auch die von FgaPT2 C4-monoprenylierten Indolderivate besser akzeptiert. In der Tandemreaktion von 7-DMATS, gefolgt von FgaPT2 wurden zunächst C7-prenylierte Indolderivate gebildet, welche von FgaPT2 nur schlecht umgesetzt werden konnten.

Tabelle 3-17: Umsetzung von Tryptophanderivaten mit Modifikationen am Indolring durch Tandeminkubationen mit FgaPT2 und 7-DMATS bei der Produktion von diprenylierten Indolderivaten.

Substrat				Umsetzung [%] abhängig von der Reaktionsreihenfolge	
	R ₁	R ₂	R ₃	FgaPT2/7-DMATS	7-DMATS/FgaPT2
5-Methyl-DL-Tryptophan	H	CH ₃	H	24.3 ± 0	0.9 ± 0.4
6-Methyl-DL-Tryptophan	H	H	CH ₃	2.6 ± 1.4	1.5 ± 0.8
5-Methoxy-DL-Tryptophan	H	OCH ₃	H	10.3 ± 0.8	3.5 ± 1.4

In einem zusätzlichen Assay wurde eine weitere Möglichkeit zur Herstellung diprenylierter Indolderivate untersucht. Mit L-Tryptophan als Substrat erfolgte die Inkubation mit beiden Enzymen gleichzeitig. Ein Vergleich der Umsetzung des Substrates zu dem entsprechenden diprenylierten Produkt zeigte, dass diese Strategie nicht zu einer Verbesserung der Ausbeute geführt hatte (Abbildung 3-20).

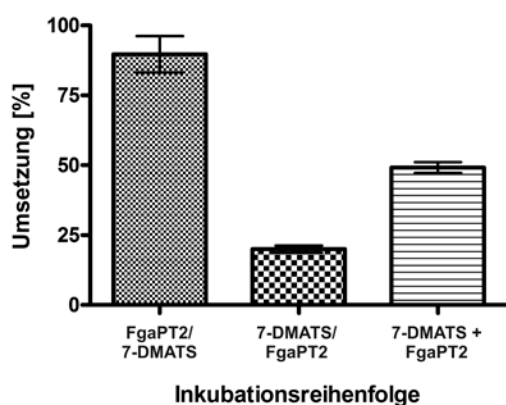


Abbildung 3-20: Vergleich der Umsetzung von L-Tryptophan zu seinem 4,7-diprenylierten Produkt nach verschiedenen Inkubationen mit FgaPT2 und 7-DMATS.

Die Präsenz von zwei Prenylresten an Positionen C4 und C7 am Indolring wurde anschließend durch Isolierung und ¹H-NMR-Analyse der enzymatischen Produkte von L-Tryptophan, L-Abrin und 11-Methyl-DL-Tryptophan nachgewiesen. Diese Arbeiten wurden von Frau Prof. Dr. H. Ruan durchgeführt.

3.6 Mutagenese zur Änderung der Regiospezifität von FgaPT2 und 7-DMATS

3.6.1 Einleitung

Die zwei Prenyltransferasen FgaPT2 und 7-DMATS aus *A. fumigatus* sowie die kürzlich charakterisierte 5-DMATS aus *A. clavatus* katalysieren den Transfer des Prenylrests von DMAPP auf L-Tryptophan. Dabei arbeiten alle drei Enzyme regiospezifisch: FgaPT2 katalysiert die Prenylreaktion an Position C4 des Indolrings (Steffan *et al.*, 2007), 5-DMATS an Position C5 (Yu *et al.*, 2012) und 7-DMATS an Position C7 (Kremer *et al.*, 2007).

Durch Aufklärung der Kristallstruktur von FgaPT2 ist der erste Einblick in die Architektur und das aktive Zentrum einer pilzlichen Prenyltransferase der DMATS-Familie gelungen (Metzger *et al.*, 2009). Dabei konnten unter anderem die für die Regiospezifität dieses Enzyms verantwortlichen Aminosäurereste Y191, R244, I80, L81 und E89 und K174 postuliert werden (Abbildung 3-21). Basierend auf diesen Informationen und mit dem Ziel, die Regiospezifität von FgaPT2 und 7-DMATS zu verändern, wurde eine Mutagenese durchgeführt.

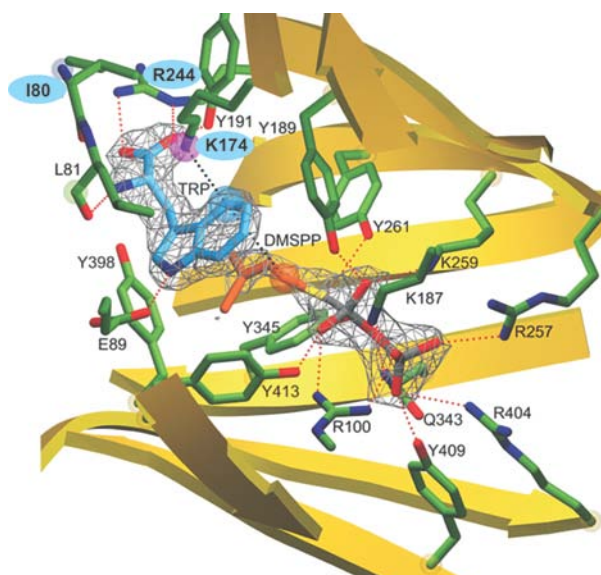


Abbildung 3-21: Aktives Zentrum von FgaPT2 (Metzger *et al.*, 2009). Aminosäurereste, die zur Änderung der Regiospezifität mutiert wurden, sind blau markiert.

3.6.2 Sequenzanalyse und Einführung von Mutationen

Zur Bestimmung der zu mutierenden Aminosäurereste wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von FgaPT2, 7-DMATS und 5-DMATS durchgeführt (Abbildung 3-22).

FgaPT2 Af	1	-----MKAAN--ASSAEAYRVLSRAFRFDNEDQKL--WWHSTAPMFAK	39
5-DMATS Ac	1	-----MPHQNSPNTTLEPFQLLSKVLTFFPNEDQRD--WWHSTGPMLAK	41
7-DMATS Af	1	MSIGAEIDSLVPAPPGLNGTAAGYPAKTQKELSNQDFDAHDGLSLAQLTPYDVLTAALPLPAPASSTGFWWRETGPVMSK	80
FgaPT2 Af	40	MLETANYTTTCQYQYLITYKECVIPSLG-----CYPTNSAPRWLSILTRYGTPFELSLNCS-----NSIVRYTFEPI	106
5-DMATS Ac	42	MLRDAGYDIHAQYVHLCVHHKCIVPYLG-----PYPANGQERWMSVLSRFGLPYELSLNCS-----RSVVGFAPFEPI	108
7-DMATS Af	81	LLAKANYPLYTHYKYLMLYHHTHILPLLGPRLPLENSTHPSPSNAPWRSILTDDFTPLEPSWNVNGNSEAQSTIRLGIEPI	160
FgaPT2 Af	107	NQHTGTDKDPFNTHAIWESLQHLLPLEKSIDLEWFRHFKHDLTLNSEESAFLAHNDRLVGGTIRTQNKLLALDLKDGRFAL	186
5-DMATS Ac	109	GPLSGTEQDPFNAHVIWECLDMLARLDPSIDLQWFTQFKEDLVLGDDAEARFVRERG-LDRGQVCTQNKLLGLDLGSRFEV	187
7-DMATS Af	161	GFEAGAAADPFNQAAVTQFMHSYEATEVGGATLTLEHFRNDMFVG--PETYAALRAKIPEGEHTTQSLAFDLDAGRVTT	238
FgaPT2 Af	187	* KTYIYPALKAVVTGKTIHELTVGSVRRRLAV----REPRILPPLNMLEEYIRSRGSKSTASPLVSCDLTSPAKSRIKIYL	262
5-DMATS Ac	188	KMYMPYLKSVATGVPIDQLMFDSVRKVD----RGQKLAGPLSILEEYIKSHRNK-TLSTRLISCDLVDPSSQSRIKIYV	261
7-DMATS Af	239	KAYFFPILMSLKTGQSTTKVVSISILHLALKSEVWGVQTIAAMSVMEAWIGSYGGA--AKTEMISVDCVNEADSRIKIYV	316
FgaPT2 Af	263	LEQMVSLAEMEDLWTLGGRRRDASTLEGLSLVRELWDLIQLSPGLKSPAPYPLPLGVIPDERLPLMANFTLHQNDPVPEP	342
5-DMATS Ac	262	AESVDWEHLEDIWTGLHRRRNPNVAMRGLEQLRELWDLINIEGPGSHFRDGYLNLGSEVDERLPLMANFTLSPKERYPAP	341
7-DMATS Af	317	RMPHTSLRKVKEAYCLGGRLTDENTKEGLKLLDELWRTVFG-----IDDEDAELPQNSHRTAGTIFNFEIRPGKWFPEP	390
FgaPT2 Af	343	* QVYFTT--FGMNDMAVADALTTFERRGWSEMARYETTLKSYYPHADHDKLNYLHAYISFSYRDRTPLVSVYLSQSFET	419
5-DMATS Ac	342	QIYFHT--FGMSDAVADAVATFCARRGWTEMAESYKANLFSYYPDGDVNEMNYLQSLISFSYRNEKA-YLSVYLHTFET	418
7-DMATS Af	391	KVYLPVRHYCESDMQIASRLQTFGRGLGWHNMEKDYCKHLEDLFPHHPLSSSTGTHTFLSFSYKKQKGVYMTMYNLRVY	470
FgaPT2 Af	420	GDWAVANLSESKVKCQDAACQPTALPPDLSTKGVYYSGLH	459
5-DMATS Ac	419	GGYRKS----WKL-----	427
7-DMATS Af	471	ST-----	472

Abbildung 3-22: Vergleich der Aminosäuresequenzen von FgaPT2, 5-DMATS und 7-DMATS. Aminosäurereste zur Koordination des Prenyldiphosphates in FgaPT2 (grün) und die, die das Carbeniumion vor Reaktionen mit Nukleophilen abschirmen (blau) liegen in allen drei Enzymen mit zwei Ausnahmen konserviert vor. * kennzeichnet Aminosäuren, die beide Funktionen haben. Die an der regiospezifischen Prenylierung von L-Tryptophan in FgaPT2 beteiligten Reste sind rot markiert. Alle für die zielgerichtete Mutagenese ausgewählten Aminosäurereste sind grau unterlegt.

Dieser Vergleich zeigte deutlich, dass die meisten Aminosäurereste, die in FgaPT2 in die Koordination des Prenyldiphosphates involviert sind oder das aus DMAPP gebildete reaktive Carbeniumion vor Reaktionen mit Nukleophilen schützen, in 5-DMATS und 7-DMATS konserviert vorliegen. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich viele der für die Koordination von L-Tryptophan zuständigen Aminosäuren (Abbildung 3-22 und Tabelle 3-18), was durch unterschiedliche Positionierung des Substrates im aktiven Zentrum und eine daraus resultierende unterschiedliche Regiospezifität erklärt werden kann. Für die zielgerichtete Mutagenese in FgaPT2 wurden drei Aminosäurereste ausgewählt: I80, K174 und R244. Für die Auswahl von K174 war seine essentielle Bedeutung für die Abstraktion des Protons an Position C4 des Indolrings in FgaPT2 und somit für die Regiospezifität dieser Prenyltransferase maßgebend. Die zu I80 und R244 korrespondierenden Aminosäurereste lagen in 7-DMATS nicht konserviert vor und könnten dadurch ebenfalls zu der Regiospezifität beitragen.

Tabelle 3-18: Für die Regiospezifität von FgaPT2 verantwortlichen Aminosäurereste und entsprechende Aminosäuren in 5-DMATS bzw. 7-DMATS. Für die Mutageneseexperimente ausgewählten Aminosäuren sind fett markiert.

Funktion der Aminosäure in FgaPT2	FgaPT2 (C4-Prenylierung)	5-DMATS (C5-Prenylierung)	7-DMATS (C7-Prenylierung)
	Y191	Y192	F243
	R244	R243	E298
Erkennung und Koordination von L-Tryptophan	I80	V82	F129
	L81	L83	L130
	E89	E89	E138
Abstraktion des Protons an Position C4 des Indolrings	K174	K175	F226

Mit Hilfe der QuikChangeTM Methode (2.6.7.2) wurden diese Aminosäuren durch die entsprechenden in 7-DMATS vorhandenen Aminosäurereste ausgetauscht, nämlich I80 bzw. K174 durch Phenylalanin und R244 durch Glutaminsäure. Da die Koordination von L-Tryptophan im aktiven Zentrum beider Enzyme durch mehrere Aminosäuren vermittelt wird, sollte der Austausch einer einzelnen Aminosäure nicht zu der gewünschten Änderung der Lage des aromatischen Substrates führen. Aus diesem Grund wurden ebenfalls Doppelmutanten und eine Tripelmutante generiert (Tabelle 3-19). Analog dazu erfolgte der Austausch entsprechender Aminosäuren in 7-DMATS. Hierfür wurde die von Zheng *et al.* (2004) beschriebene Methode (2.6.7.2) verwendet.

Tabelle 3-19: Übersicht über die erzeugten Derivate von FgaPT2 und 7-DMATS

Derivat von FgaPT2	Expressions-konstrukt	Derivat von 7-DMATS	Expressions-konstrukt
FgaPT2_I80F	pES25	7-DMATS_F129I	pES30
FgaPT2_K174F	pES26	7-DMATS_F226K	pES31
FgaPT2_R244E	pES27	7-DMATS_E298R	pES32
FgaPT2_I80F_K174	pES33	7-DMATS_F129I_F226K	pES36
FgaPT2_K174F_R244E	pES34	7-DMATS_F226K_E298R	pES37
FgaPT2_I80F_R244E	pES35	7-DMATS_F129I_E298R	pES38
FgaPT2_I80F_K174F_R244E	pES39	7-DMATS_F129I_F226K_E298R	pES40

Nach Einführung der gewünschten Mutationen erfolgte die Überprüfung der erhaltenen Plasmide durch Sequenzierung. Anschließend wurden die Plasmide zur Expression der

mutierten Derivate von *fgaPT2* zur Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS und zur Expression der mutierten *7-dmats*-Derivate zur Transformation in *E. coli* XL1 blue MRF⁺ verwendet.

3.6.3 Überproduktion der Proteine und ihre Aufreinigung

Die mutierten His₈-Derivate von FgaPT2 und His₆-Derivate von 7-DMATS wurden unter den zuvor für die Wildtyp-Enzyme beschriebenen Bedingungen (Kremer *et al.*, 2007; Steffan *et al.*, 2007) überproduziert und anschließend mit Hilfe der Affinitätschromatographie aus den löslichen Proteinfractionen isoliert (2.7.2, 2.7.3). Als Positivkontrollen dienten die nicht mutierten Enzyme FgaPT2 und 7-DMATS. Die Größe der gereinigten Derivate von FgaPT2 (Abbildung 3-23) entsprach mit ca. 57 kDa der für Wildtyp-FgaPT2 beobachteten Masse. Mit Ausnahme von FgaPT2_I80F war die Überproduktion der mutierten Derivate etwas höher als die des nicht mutierten Enzyms. Die Intensität der Proteinbande von FgaPT2_I80F entsprach der von FgaPT2 und ließ auf eine vergleichbare Überproduktion der Enzyme schließen.

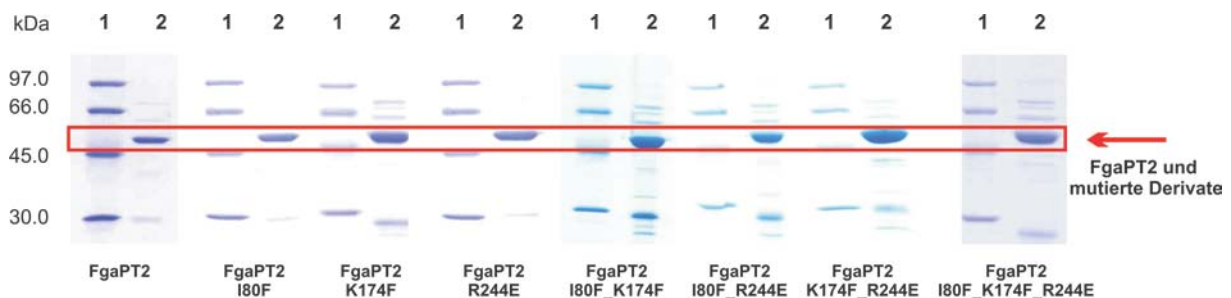


Abbildung 3-23: SDS-PAGE nach Aufreinigung von His₈-FgaPT2 und mutierten Derivaten. Erwartete Größe der Proteine betrug 56 kDa. P: Proteingrößenstandard, 2: gereinigtes Enzym

Das Resultat der SDS-PAGE-Analyse nach Aufreinigung von 7-DMATS und seinen Derivaten (Abbildung 3-24) zeigte, dass mit Ausnahme von 7-DMATS_F226K_E298R alle Proteine erfolgreich überproduziert wurden. Dabei war die Überproduktion der Einzelmutanten 7-DMATS_F129I, 7-DMATS_E298R und der Tripelmutante 7-DMATS_F129I_F226K_E298R etwas höher als die des Wildtyp-Enzyms. Die Größe der Proteine betrug ca. 50 kDa und war mit der Größe des nicht mutierten 7-DMATS vergleichbar.

Das Protein 7-DMATS_F226K_E298R konnte trotz mehrmaliger Versuche nicht produziert werden. Es ist denkbar, dass die eingeführten Mutationen einen negativen Einfluss auf die Proteinproduktion haben.

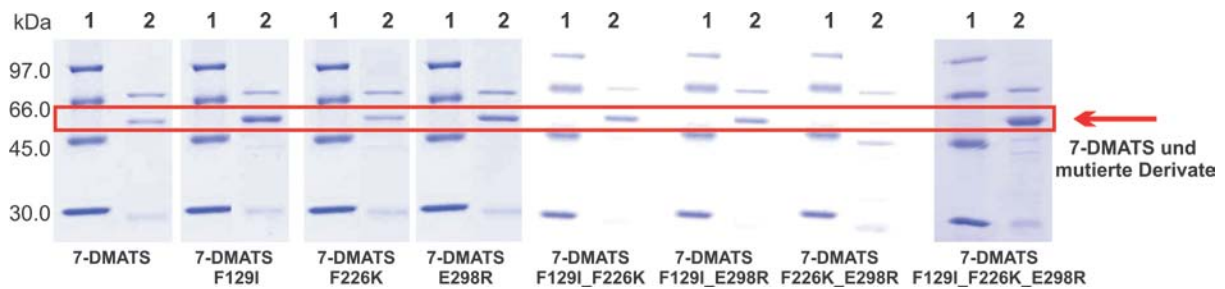


Abbildung 3-24: SDS-PAGE nach Aufreinigung von His₆-7-DMATS und mutierten Derivaten. Erwartete Größe der Proteine betrug 54 kDa. 1: Proteingrößenstandard, 2: gereinigtes Protein.

3.6.4 Untersuchung der Regiospezifität der mutierten Derivate von FgaPT2 und 7-DMATS

Um den Einfluss der eingeführten Mutationen auf die Regiospezifität von FgaPT2 und 7-DMATS zu untersuchen, wurden Assays in Anwesenheit von L-Tryptophan und DMAPP mit den gereinigten Enzymen für 16 h inkubiert (2.7.7.2), wobei FgaPT2 und 7-DMATS als Positivkontrollen dienten. Aus der HPLC-Analyse der Assays (2.8.1.6) erhaltene Daten (Abbildung 3-25) wurden im Hinblick auf die Retentionszeiten der enzymatischen Produkte überprüft. Eine Änderung der Retentionszeit im Vergleich zu 4-DMAT in den Assays mit FgaPT2-Derivaten bzw. zu 7-DMAT in den Assays mit 7-DMATS-Derivaten sollte Hinweise auf die erwartete Änderung der Prenylierungsposition liefern. Die meisten in FgaPT2 eingeführten Mutationen resultierten in der Bildung von geringfügigen Mengen neuer enzymatischer Produkte neben 4-DMAT (Tabelle 3-20). Die Einzelmutanten FgaPT2_K174F und FgaPT2_R244E, die Doppelmutante FgaPT2_K174F_R244E sowie die Tripelmutante zeigten relative Aktivitäten von maximal 0.6 % (Tabelle 3-20), so dass eine Analyse der gebildeten Produkte unmöglich war. Die Substitution I80F führte nicht zu der gewünschten Änderung der Regiospezifität. Zwar wurde für FgaPT2_I80F eine Produktbildung mit der relativen Aktivität von 83.6 % beobachtet, jedoch konnte das enzymatische Produkt durch Vergleich der Retentionszeiten als 4-DMAT identifiziert werden. Zwei Produktpeaks konnten in den HPLC-Chromatogrammen von FgaPT2_I80F_R244E beobachtet werden, wobei die relative Umsetzung von L-Tryptophan zu dem ersten Produkt 11.9 % und zu dem zweiten 2.2 % betrug und damit deutlich niedriger war als die von Wildtyp-FgaPT2. Ein Vergleich der Retentionszeiten (Abbildung 3-25) zeigte, dass es sich bei den beiden Substanzen wahrscheinlich um 4- und 7-DMAT handelte. Um diese Annahme zu überprüfen, sollten beide Produkte isoliert und zur Bestimmung der Prenylierungspositionen mittels NMR analysiert werden.

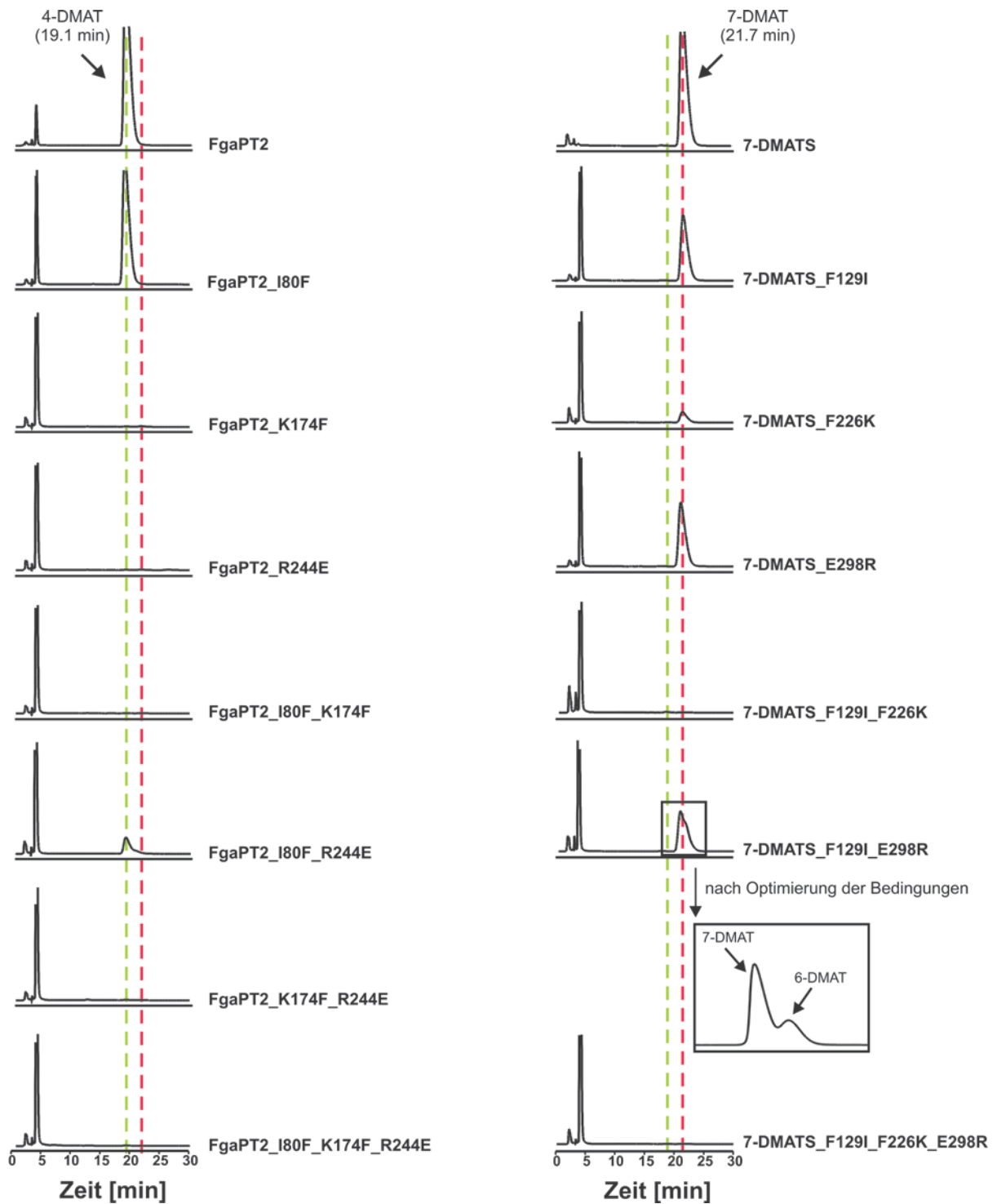


Abbildung 3-25: HPLC-Chromatogramme der Assays von FgaPT2, 7-DMATS und ihren mutierten Derivaten. Die Retentionszeiten der enzymatischen Produkte von FgaPT2 (4-DMAT) und von 7-DMATS (7-DMAT) sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Tabelle 3-20: Relative Aktivitäten und Retentionszeiten der von FgaPT2, 7-DMATS und ihren mutierten Derivaten gebildeten Produkte nach einer Inkubation in Anwesenheit von L-Tryptophan und DMAPP für 16 h. P2: 4-DMAT, P4: 7-DMAT.

FgaPT2 und Derivate	P1 (12.8 min) [%]	P2 (19.1 min) [%]	P3 (20.6min) [%]	P4 (21.7 min) [%]	7-DMATS und Derivate	P4 (21.7 min) [%]	P5 (21.1 min) [%]
FgaPT2	≤ 0,2	100,0 ± 2,3	≤ 0,2	≤ 0,2	7-DMATS	100,0 ± 0,2	≤ 0,2
I80F	≤ 0,2	83,6 ± 1,9	≤ 0,2	≤ 0,2	F129I	47,7 ± 0	≤ 0,2
K174F	≤ 0,2	0,5 ± 0,1	≤ 0,2	0,6 ± 0	F226K	8,8 ± 0,3	≤ 0,2
R244E	≤ 0,2	0,3 ± 0	≤ 0,2	0,5 ± 0,1	E298R	47,9 ± 0,1	≤ 0,2
I80F_K174	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	F129I_F226K	0,5 ± 0,1	≤ 0,2
I80F_R244E	≤ 0,2	11,9 ± 0,1	2,2 ± 0,1	≤ 0,2	F129I_E298R	17,2 ± 0,7	20,9 ± 0,5
K174F_R244E	0,4 ± 0	0,4 ± 0,1	≤ 0,2	≤ 0,2	F226K_E298R	keine Genexpression	-
I80F_K174F_R244E	≤ 0,2	0,3 ± 0	≤ 0,2	≤ 0,2	F129I_F226K_E298R	≤ 0,2	≤ 0,2

Der Austausch der Aminosäurereste in 7-DMATS führte zu anderen Ergebnissen. Die Substitutionen F129I und E298R haben eine Aktivitätsreduktion von ca. 50 % im Vergleich zum Wildtyp verursacht, resultierten jedoch nicht in der gewünschten Änderung der Regiospezifität. Auch die Einzelmutante 7-DMATS_F226K sowie die Doppelmutante 7-DMATS_F129I_F226K produzierten weiterhin 7-DMAT. Der Austausch von allen drei Aminosäureresten führte in 7-DMATS zu einem vollständigen Aktivitätsverlust.

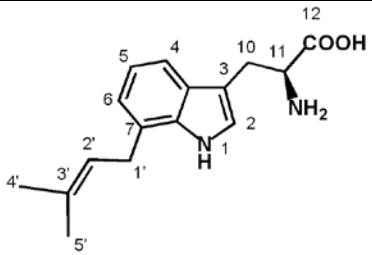
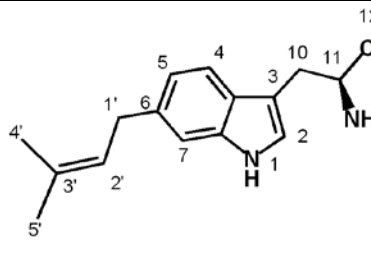
Ähnlich wie für die entsprechende Mutation in FgaPT2 beobachtet wurde, konnten in den Chromatogrammen der Doppelmutante 7-DMATS_F129I_E298R zwei enzymatische Produkte mit ähnlichen Retentionszeiten detektiert werden. Der erste Peak bei 21.7 min zeigte dieselbe Retentionszeit wie das vom Wildtyp-Enzym gebildete 7-DMAT. Der zweite Peak wies eine Retentionszeit von 20.9 min auf und konnte damit nicht als eine der Standardsubstanzen identifiziert werden. Zur eindeutigen Bestimmung der Prenylierungspositionen in den entstandenen Produkten wurden diese mittels NMR analysiert.

3.6.5 Identifizierung der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R als 6- und 7-DMAT

Die enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R wurden als Gemisch isoliert (2.8.1.6) und mittels ^1H -NMR, HMBC und HSQC analysiert. Die ^1H -NMR-Analyse (Anhang, 6.8) zeigte deutlich Signale für zwei Substanzen (A und B), die im Verhältnis 2:1 vorlagen und jeweils einen regulär angefügten Prenylrest besaßen. Die Anwesenheit einer regulären Prenylgruppe am Indolring von Substanz A wurde durch die Signale bei 3.51 ppm (d) für H-1', 5.42 ppm (t) für H-2' sowie bei 1.71 ppm (s) für H-4' und H-5' bestätigt. HMBC- und HSQC-Analysen erbrachten den eindeutigen Nachweis dafür, dass es sich bei Substanz A um 7-DMAT handelt, da das Duplett von H-1' bei 3.51 ppm Korrelationen mit den Signalen für C-6, C-7, C-8, C-2' sowie C-3' zeigte. Ein Vergleich der Spektren mit den Daten für 7-DMAT (Kremer *et al.*, 2007) bestätigte dieses Ergebnis.

Des Weiteren konnte anhand des ^1H -NMR-Spektrums auf eine reguläre Prenylierung von Substanz B am Indolring geschlossen werden. Während das Signal für H-1' von dem Wassersignal überlagert vorlag, konnte ein Triplett bei 5.32 ppm, sowie die Singulets bei 1.71 ppm beobachtet werden. Das HMBC-Spektrum zeigte deutlich Korrelationen zwischen dem Signal für H-1' und C-5, C-6, C-7 sowie C-2' und C-3', welche einen eindeutigen Nachweis für die Prenylierung an Position C6 lieferten. Diese Daten entsprechen auch den für 6-DMAT publizierten Literaturdaten (Takahashi *et al.*, 2010).

Tabelle 3-21: ^1H - und ^{13}C -NMR Daten der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R in $\text{DMSO}-d_6$ und von 6-DMAT in CD_3OD . Aufnahme der Spektren erfolgte bei 500 MHz.

<div>  <p>7-DMAT</p> </div>				<div>  <p>6-DMAT</p> </div>				<div> <p>6-DMAT</p> <p>(Takahashi <i>et al.</i>, 2010)</p> </div>	
Position	^{13}C -NMR δ ppm	^1H -NMR δ_{H} , multi., J in Hz	HMBC Korrelationen	Position	^{13}C -NMR δ ppm	^1H -NMR δ_{H} , multi., J in Hz	HMBC Korrelationen	^{13}C -NMR δ ppm	^1H -NMR δ_{H} , multi., J in Hz
2	123.5	7.17, d (2.3)	C-3, C-8, C-9	2	123.1	7.09, s	C-3, C-8, C-9	124.6	7.11, s
3	110.3	/		3	108.5	/		109.4	/
4	115.9	7.38, d (7.8)	C-3, C-6, C-8	4	118.1	7.43, d, (8.1)	C-3, C-6, C-8	119.2	7.58, d, (7.8)
5	118.4	6.91, t, (7.5)	C-7, C-9	5	119.4	6.81, dd, (8.1, 1.4)	C-7, C-9, C-1'	121.3	6.88, dd, (8.0;
6	119.9	6.84, d (6.7)	C-4, C-8, C-1'	6	134.2	/		136.8	/
7	124.0	/		7	110.1	7.10, s	C-5, C-9, C-1'	111.6	7.14, s
8	134.9	/		8	136.8	/		138.8	k.A.
9	127.2	/		9	125.4	/		126.6	k.A.
10	27.1	2.90, dd, (9.1, 14.9)	C-2, C-3, C-9, C-11, C-12	10	27.0	2.87, dd, (9.1, 14.9)	C-3, C-9, C-11	28.6	k.A.
11	54.6	3.37 *		11	54.6	3.38*		56.7	k.A.
12	171.3	/		12	171.3	/		174.5	k.A.
1'	28.8	3.51, d, (7.4)	C-6, C-7, C-8, C-2', C-3'	1'	33.8	3.36*	C-5, C-6, C-7, C-2', C-3'	35.5	3.40, d, (7.3)
2'	122.3	5.42, t, (7.3)	C-1', C-4', C-5'	2'	124.3	5.32, t, (7.4)	C-4', C-5'	125.5	5.34, t, (7.3)
3'	131.7	/		3'	131,2	/		132.5	/
4'	17.3	1.71, s	C-2', C-3', C-5'	4'	17.3	1.71, s	C-2', C-3', C-5'	17.8	1.73, s
5'	25.2	1.71, s	C-2', C-3', C-4'	5'	25.2	1.71, s	C-2', C-3', C-4'	25.9	1.73, s

* Signale überlappen mit denen des Lösungsmittels, k.A.: keine Angabe

4 Diskussion

4.1 Die Farnesyltransferase AuaA aus *S. aurantiaca* Sg a15

In der vorliegenden Arbeit wurde die Klonierung und Expression des Gens *auaA* aus dem Biosynthesecuster für Aurachine beschrieben. Eine biochemische Charakterisierung des Genproduktes AuaA zeigte, dass es sich hierbei um eine membrangebundene Farnesyltransferase handelt, die für die Bildung von Aurachin D durch Übertragung eines Farnesylrests von FPP auf 2-Methyl-4-Hydroxychinolin an Position C3 des Chinolins verantwortlich ist.

Das Enzym wies eine relativ breite Substratspezifität auf und akzeptierte neben dem natürlichen Substrat auch weitere 4-Hydroxychinoline. Zusätzlich wurde eine geringe Umsetzung auch mit einigen wenigen Hydroxynaphthalinen sowie Flavonoiden in Anwesenheit von FPP detektiert. Eine solche Substratpromiskuität ist bei vielen aromatischen Prenyltransferasen bekannt (Bonitz *et al.*, 2011; Steffan & Li, 2009). Sie wurde bisher jedoch nur für Indole, Naphthaline, Flavonoide und andere aromatische Substrate, aber nicht für Chinoline, beschrieben. Durch diese Eigenschaft ist AuaA ein sehr interessantes Enzym im Hinblick auf die Produktion von neuen prenylierten Naturstoffen. Darüber hinaus verwendet AuaA FPP als Prenyldonor, während andere gut charakterisierte aromatische Prenyltransferasen hauptsächlich DMAPP oder GPP als Prenyldonoren umsetzen (Heide, 2009a; Li, 2010; Yazaki *et al.*, 2009). Mit Hilfe chemoenzymatischer Synthese könnten also unter Verwendung dieses heterolog exprimierten Enzyms nicht nur farnesylierte Hydroxychinoline, sondern auch farnesylierte Naphthaline oder Flavonoide hergestellt werden. Für eine erfolgreiche biotechnologische Anwendung sollte allerdings die Umsetzung dieser Substrate durch weitere Experimente optimiert werden. Mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese, zum Beispiel, könnten Derivate von AuaA mit einer erhöhten katalytischen Effizienz erzeugt werden oder mit einer veränderten Regiospezifität, welche das Spektrum der neuen prenylierten Produkte noch erweitern würde.

Bisher sind leider keine Daten über die 3D-Struktur einer membrangebundenen Prenyltransferase bekannt. Durch Mutagenesestudien unterstützte Modelle von zwei Enzymen dieser Gruppe, LePGT1 und UbiA, geben bisher einen Einblick in die mögliche Struktur dieser Enzyme sowie die katalytisch wichtigen Aminosäuren (Bräuer *et al.*, 2008; Ohara *et al.*, 2009). Beide Modelle unterscheiden sich geringfügig voneinander: während das Diphosphat von GPP im aktiven Zentrum von LePGT1 durch zwei Magnesiumionen koordiniert wird, ist nur ein Mg^{2+} -Ion an der Koordination des Diphosphates in UbiA beteiligt. Darüber hinaus schlagen Ohara *et al.* (2009) drei Asparaginsäurereste zur Bindung von

Magnesium in Motiv I vor. In dem Modell von UbiA dagegen sollen nur zwei Asparaginsäurereste in die Erkennung des Metallions involviert sein.

Basierend auf dem Modell von UbiA wurde auch ein Modell von AuaA erstellt (Brandt *et al.*, 2009). In diesem Modell haben die Autoren ebenfalls zwei Asparaginsäurereste (D56 und D60) zur Bindung des Prenyldiphosphates vorgeschlagen.

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden ausgewählte Aminosäurereste in beiden aspartatreichen Motiven in AuaA untersucht. Der Aktivitätsverlust, welcher nach der Substitution der konservierten Asparaginsäurereste D56, D60 in Motiv I in AuaA beobachtet wurde, bestätigte die Rolle dieser Reste bei der Erkennung des Prenyldiphosphates. Die Mutation von Asparagin in Motiv I bzw. der Asparaginsäurereste in Motiv II hatte ähnliche Auswirkung auf die Aktivität von AuaA wie die Mutationen in LePGT1. Auch hier weist ein deutlicher Aktivitätsverlust auf die Wichtigkeit dieser Reste für die Prenylierung hin. Die verbleibende Enzymaktivität von 37 % in AuaA nach der Substitution R53A steht jedoch im Widerspruch zu der Senkung der Aktivität um mehr als 98 % in LePGT1 durch die entsprechende Substitution D84A.

LePGT1 und AuaA sind bisher die einzigen Prenyltransferasen, in denen zusätzlich zu den konservierten Asparaginsäureresten weitere Aminosäuren ausgetauscht wurden. Es ist denkbar, dass der Asparaginsäurerest in MenA, Coq2 oder OsPPT1, welcher D84 in LePGT1 entspricht, ebenso essentiell ist für die Aktivität dieser Enzyme, während der entsprechende Glutaminrest in SfN8DT, GmG4DT, SfG6DT und AtHPT wie R53 in AuaA nicht direkt in die Katalyse involviert ist.

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Auswirkung des Aminosäureaustausches an dieser Position in AuaA und LePGT1 sowie der Tatsache, dass die Aminosäurereste in den verglichenen Sequenzen (Abbildung 3-10) an dieser Position nicht hochkonserviert vorliegen, sollte das Motiv NxxxDxxD (Motiv I), für die Bindung des Prenyldiphosphates verantwortlich sein und nicht wie bisher vorgeschlagen (NDxxDxxxD, NQxxDxxxD, DDxxDxxxD, DQxxDxxxD DQxxExxxD und NQxxExxxD).

Die beiden Modelle von LePGT1 und UbiA wurden anhand von verschiedenen Vorlagen erstellt. Das Modell von LePGT1 orientiert sich an der Struktur der menschlichen FPP-Synthase, während 5-epi-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* als Vorlage für UbiA fungierte. Es wäre interessant, diese Modelle mit den Ergebnissen aus der Mutagenese von AuaA weiterzuentwickeln.

4.2 Zielgerichtete Mutagenese zur Untersuchung katalytisch wichtiger Aminosäurereste in FgaPT2, 7-DMATS und FtmPT1

Die Tatsache, dass die katalytische Aktivität pilzlicher aromatischer Prenyltransferasen der DMATS-Familie unabhängig ist von der Anwesenheit divalenter Metallionen, führte zu der Annahme, dass das Prenyldiphosphat mit Hilfe basischer Aminosäurereste im aktiven Zentrum dieser Enzyme koordiniert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden drei konservierte, basische Aminosäurereste ausgewählt, deren Bedeutung für die Prenylierungsreaktion durch zielgerichtete Mutagenese in FgaPT2, FtmPT1 und 7-DMATS untersucht wurde. Da zu dem damaligen Zeitpunkt keine Informationen über die 3D-Struktur von pilzlichen Prenyltransferasen vorlagen, erfolgte die Auswahl der zu mutierenden Aminosäuren anhand von Sequenzvergleichen bekannter Prenyltransferasen dieser Enzymgruppe.

In FgaPT2 führten die Substitutionen der Lysinreste K187 und K259 durch Glutaminsäure zu einem deutlichen Aktivitätsverlust von mehr als 97 % im Vergleich zu Wildtyp-FgaPT2, wodurch die Bedeutung dieser Reste für die katalytische Aktivität von FgaPT2 demonstriert wurde. Der Austausch von Arginin 257 durch Glycin resultierte ebenfalls in einer starken Senkung der Enzymaktivität. Nach Einführung der Mutation wies das Derivat FgaPT2_R257G lediglich eine Aktivität von 4.7 % auf und zeigte damit die Wichtigkeit dieser Aminosäure für die Prenylierungsreaktion auf.

Ähnliche Auswirkung der Substitutionen von Lysinresten wurde für FtmPT1 und 7-DMATS beobachtet. Hier konnte nach dem Austausch von K201 und K294 in FtmPT1 bzw. K239 und K313 in 7-DMATS durch Glutaminsäure keine Aktivität mehr detektiert werden. Dieses Ergebnis weist auf eine essentielle Bedeutung dieser beiden Aminosäuren für die Katalyse beider Enzyme hin und eine mögliche Rolle in der direkten Bindung von DMAPP. Anders als bei FgaPT2 hatten die Mutationen R292G in FtmPT1 und R311G in 7-DMATS wenig Einfluss auf die Enzymaktivität. Für die entsprechenden Derivate von FtmPT1 und 7-DMATS konnte eine Aktivität von 48.2 % bzw. 36.7 % bestimmt werden, wodurch die direkte Beteiligung der Argininreste in die Koordination von DMAPP in diesen Prenyltransferasen ausgeschlossen wurde.

Zielgerichtete Mutagenese wurde auch zur Untersuchung ausgewählter Aminosäurereste in MaPT, einem Homolog von FgaPT2 aus *Malbranchea aurantiaca*, durchgeführt. Unter anderem erfolgte hier der Austausch von K189 (entspricht K187 in FgaPT2) durch Glutaminsäure bzw. Leucin. Ähnlich wie in FgaPT2 verursachte die Mutation eine deutliche Reduktion der Enzymaktivität auf 1.1 bzw. 0.9 % im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym. Nach der Substitution von K261 (K259 in FgaPT2) durch Glutaminsäure bzw. Leucin konnte wie für FgaPT2 keine Produktbildung mehr nachgewiesen werden.

Später wurden die Kristallstrukturen von FgaPT2 und FtmPT1 aufgeklärt (Jost *et al.*, 2010; Metzger *et al.*, 2009). Die aus der Kristallisierung von FgaPT2 gewonnenen Informationen über das aktive Zentrum dieses Enzyms (Abbildung 4-1, A) bestätigen die Ergebnisse der Mutageneseversuche. Sowohl die Lysinreste K187 und K259 als auch R257 sind im aktiven Zentrum von FgaPT2 lokalisiert und an der Koordination des Prenyldiphosphates beteiligt.

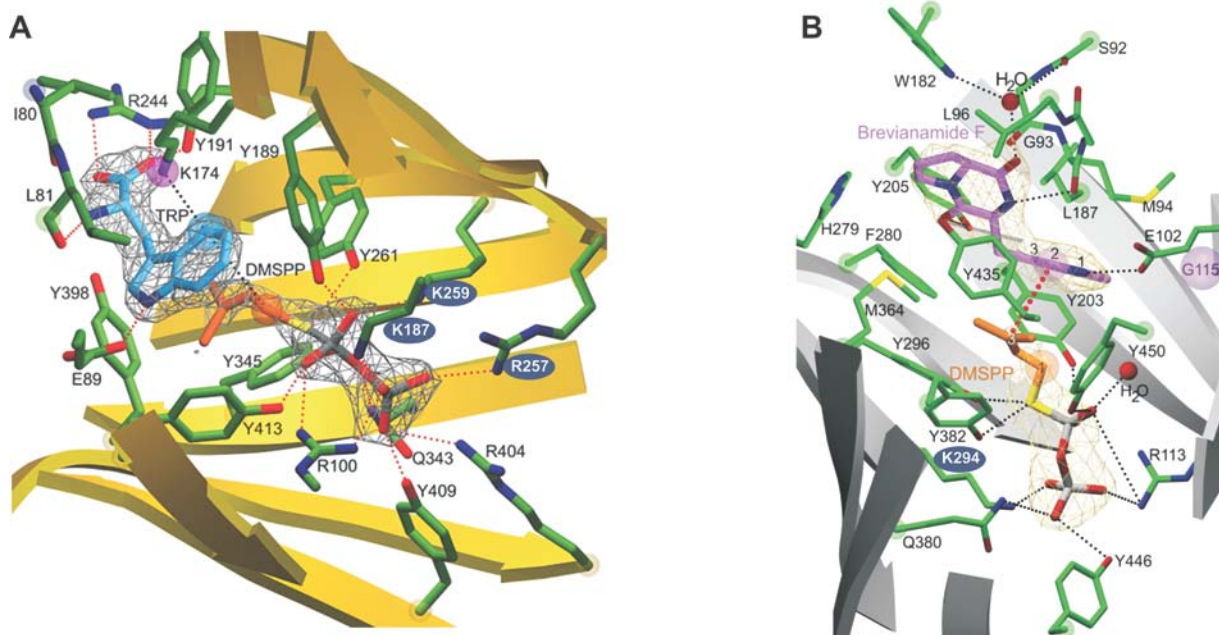


Abbildung 4-1: Aktive Zentren von A) FgaPT2 (modifiziert nach Metzger *et al.*, 2009) und B) FtmPT1 (modifiziert nach Jost *et al.*, 2010). Die mittels zielgerichteter Mutagenese untersuchten basischen Aminosäurereste sind blau unterlegt.

Bei Betrachtung des aktiven Zentrums von FtmPT1 (Abbildung 4-1, B) fällt auf, dass hier nur eine der drei untersuchten basischen Aminosäurereste, K294, in die Bindung des Diphosphates involviert ist. Diese Tatsache steht im Widerspruch zu dem im Rahmen der Mutageneseexperimente beobachteten Aktivitätsverlust für FtmPT1_K201E. Erwartungsgemäß sollte dieser Verlust von Enzymaktivität ein Indiz für die Wichtigkeit dieser Aminosäure für die Prenylierungsreaktion sein.

Da die Derivate von FtmPT1 und 7-DMATS ein ähnliches Verhalten nach Durchführung der Mutationen zeigten, wäre es interessant diese Daten mit Informationen über das aktive Zentrum von 7-DMATS zu vergleichen, wenn die Kristallisation dieses Enzyms erfolgt.

4.3 Zielgerichtete Mutagenese zur Unterstützung der Kristallstruktur von FgaPT2

Der Einblick in das aktive Zentrum von FgaPT2 erlaubte die Formulierung eines Reaktionsmechanismus für den regiospezifischen Prenyltransfer von DMAPP auf den Indolring des aromatischen Substrates L-Tryptophan. Um die zentrale Rolle von drei Aminosäureresten (E89, R100 und K174) in der Prenylierungsreaktion zu demonstrieren, wurden diese einer Mutagenese unterzogen. Aufgrund der positiven Ladung sollte R100 direkt an der Bindung des Prenyldiphosphates beteiligt sein. Zusätzlich wurde aufgrund seiner Lage im aktiven Zentrum vermutet, dass dieser Argininrest die Unabhängigkeit der FgaPT2-Aktivität von divalenten Metallionen erklären könnte. Eine Überlagerung der Kristallstruktur von FgaPT2 mit der des metallionenabhängigen Enzyms NphB zeigte nämlich, dass das positiv geladene Magnesiumion im aktiven Zentrum von NphB ähnlich positioniert ist wie R100 in FgaPT2, welches dieselbe Funktion in der 4-Dimethylallyltryptophansynthase übernehmen könnte (Metzger *et al.*, 2009). Der deutliche Aktivitätsverlust von über 99 % nach Substitution von R100 durch Glutamin und von 94.8 % nach Mutation zu Asparaginsäure bestätigte diese Vermutung. Die Aminosäurereste E89 und K174 sollten direkt den regiospezifischen Prenyltransfer von DMAPP auf C4 des Indolrings im L-Tryptophan vermitteln. Durch den Austausch E89A sollte die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zwischen dem NH des Indols und der Carboxylgruppe der Glutaminsäure und somit die elektrophile Substitution durch das aus DMAPP entstandene Carbeniumion verhindert werden. Da nach erfolgter Mutation für FgaPT2 keine Produktbildung mehr detektiert werden konnte, wurde die Rolle dieses Glutaminsäurerests in dem Reaktionsmechanismus ebenfalls bestätigt.

Die Substitution von K174, dessen Aminogruppe das Proton an Position C4 abstrahieren sollte, durch Glutaminsäure, resultierte in einer starken Reduktion der Enzymaktivität um mehr als 97 % und schien die postulierte Prenylierungsreaktion ebenfalls zu bestätigen. Die Mutation K174Q führte dagegen zu einem unerwarteten Ergebnis, da das mutierte Enzym FgaPT2_K174Q dennoch eine Aktivität von nahezu 40 % im Vergleich zu Wildtyp-FgaPT2 aufwies. Die Diskrepanz zwischen der für K174 vorgeschlagenen Rolle bei dem Prenyltransfer und der für FgaPT2_K174Q beobachteten Enzymaktivität konnte durch Anwesenheit eines zusätzlichen Wassermoleküls im aktiven Zentrum des mutierten Proteins erklärt werden, welches ebenfalls als Protonenakzeptor fungieren könnte.

4.4 Herstellung diprenylierter Indolderivate durch Einsatz rekombinanter Prenyltransferasen

Wie in der Einleitung erwähnt, weisen viele prenylierte Substanzen biologische Aktivitäten auf und sind deswegen von großem Interesse für die Medizin und Pharmaindustrie. Auf der Suche nach neuen Arzneimitteln müssen Naturprodukte oft zur Verbesserung ihrer Wirksamkeit in ihrer Struktur modifiziert werden (Walsh, 2003). Diese Modifikationen wurden in den letzten Jahren häufig unter Einsatz von kombinatorischer Biosynthese, Mutasynthese und chemoenzymatischer Synthese vorgenommen. Besonders die chemoenzymatische Synthese rückte in den Vordergrund und diente unter Einsatz verschiedener pilzlicher Prenyltransferasen der DMATS-Familie als Hilfsmittel zur Modifikation vielzähliger einfacher Tryptophanderivate, tryptophanhaltiger zyklischer Dipeptide, Hydroxynaphthaline und Flavonoide durch Anfügen eines Prenylrests (Li, 2010; Yu & Li, 2011a; Yu *et al.*, 2011).

Im Rahmen dieser Dissertation konnte erstmalig gezeigt werden, dass durch Kopplung der Prenylreaktionen zweier Prenyltransferasen wie z.B. FgaPT2 und 7-DMATS, die eine ähnliche Substratspezifität aufweisen, sich aber in ihrer Regiospezifität unterscheiden, auch die Produktion einer Reihe diprenylierter Indolderivate möglich ist.

Dadurch wurde das Potential von rekombinanten Enzymen aus der Biosynthese von Sekundärmetaboliten als Werkzeug zur Produktion maßgeschneiderter Substanzen demonstriert. Eine praktische und kostengünstige Anwendung der hierfür eingesetzten Prenyltransferasen FgaPT2 und 7-DMATS wurde erreicht, indem diese Enzyme als lösliche Proteine mit geringem Zeitaufwand in *E. coli*-Zellen produziert und anschließend leicht aus den Zellen isoliert werden konnten.

4.5 Mutagenese als Mittel zur Änderung der Regiospezifität von Enzymen

Enzyme finden in der Industrie ein breites Spektrum an Anwendungen. In dem großen Bereich der sogenannten „Weißen Biotechnologie“ werden sie als Biokatalysatoren bei der Herstellung von Lebensmitteln, Textilien, Pflanzenschutzmitteln oder Wasch- und Reinigungsmitteln eingesetzt (Benjamin & Pandey, 1998; Gavrilescu & Chisti, 2005; van Beilen & Li, 2002). Enzyme können auch der Produktion von einigen Medikamenten dienen. So wird z.B. Cortison durch Kombination von chemischen und enzymatischen Verfahrensschritten synthetisiert (Dunn, 2011). Alternativ können einige Enzyme direkt als Medikamente verwendet werden. Zu diesen zählen sog. therapeutische Enzyme wie Thrombin (Lundblad *et al.*, 2004), verschiedene Lipasen und Proteasen (Sabu, 2003), sowie rekombinante monoklonale Antikörper (Ganesan *et al.*, 2010) und Wachstumshormone (Bhosle *et al.*, 2011).

Um Enzyme industriell optimal nutzen zu können, ist es oft notwendig, ihre natürlichen Eigenschaften hinsichtlich der Stabilität, der Stereoselektivität oder der Substratspezifität zu verändern. Zur Entwicklung solcher „maßgeschneiderten Enzyme“ stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Zu diesen Methoden zählen die gelenkte Evolution, bei der mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden die natürliche Evolution im Labor simuliert wird und das rationale Proteindesign, welches sich der zielgerichteten Mutagenese bedient (Antranikian & Jaeger, 2006). Eine wichtige Voraussetzung für das rationale Proteindesign ist die Kenntnis der Struktur und Funktion des Zielenzyms. Mit den Informationen können gezielt die Aminosäuren ausgetauscht werden, die für eine bestimmte Eigenschaft des Enzyms verantwortlich sind.

Eine solche Veränderung konnte im Rahmen dieser Arbeit in den Prenyltransferasen FgaPT2 und 7-DMATS durch Austausch von jeweils zwei Aminosäureresten herbeigeführt werden. Die Doppelmutanten FgaPT2_I80F_R244E und 7-DMATS_F129I_E298R zeigten eine veränderte Regiospezifität, welche sich in der Bildung von jeweils zwei an verschiedenen Positionen prenylierten Produkten äußerte. Obwohl es gelungen ist, die Änderung der Regiospezifität von FgaPT2 und 7-DMATS durch zielgerichtete Mutagenese zu beeinflussen, ist eine weitere Optimierung der Inkubationsbedingungen (z.B. der Inkubationsdauer, der eingesetzten Proteinmengen sowie der Konzentrationen von Substraten) notwendig, um die Ausbeuten der prenylierten Produkte zu verbessern.

Bei genauer Betrachtung der für die Prenylierungsreaktion in FgaPT2 verantwortlichen Aminosäurereste (Tabelle 3-18) fällt auf, dass Y191 auch in 5-DMATS konserviert ist, während in 7-DMATS an dieser Position Phenylalanin vorliegt. Durch Mutation von Y191 wurde demonstriert, dass diese Aminosäure wahrscheinlich nicht direkt in den von FgaPT2 katalysierten Prenyltransfer involviert ist, da das mutierte Derivat FgaPT2_Y191F sogar eine etwas erhöhte Aktivität von 128.6 % im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym aufwies (3.4.4). Es ist jedoch denkbar, dass der korrespondierende Aminosäurerest F243 in 7-DMATS eine Rolle bei der Prenylierung spielt. Die Prenyltransferasen der DMATS-Familie weisen untereinander mäßige Sequenzähnlichkeiten auf. Allerdings unterscheiden sie sich in Bezug auf ihre Substrat- und Regiospezifität sowie die Orientierung des angefügten Prenylrests (regulär bzw. revers). Aufgrund dieser Eigenschaften sowie der teilweise unterschiedlichen Proteingrößen kann die Form der aktiven Zentren voneinander abweichen, weshalb die Funktionen der einzelnen Aminosäurereste nicht direkt vergleichbar sind. So sind, wie bereits unter 4.2 erwähnt, die Aminosäuren K187 und R257 in FgaPT2 direkt in die Koordination des Prenyldiphosphates involviert, während die entsprechenden Aminosäurereste K201 und R292 in FtmPT1 keinen direkten Einfluss auf die von diesem Enzym katalysierte Reaktion haben (Abbildung 4-1).

Nicht auszuschließen ist auch, dass der Prenylrest in FgaPT2 statt direkt regulär an Position C4 des Indolringes, zunächst revers an Position C3 angefügt wird und das enzymatische Produkt 4-DMAT durch eine anschließende Cope-Umlagerung und Rearomatisierung entsteht (Luk *et al.*, 2011). Unter Berücksichtigung dieser Hypothese sollten die durchgeführten Substitutionen nur indirekt zu der beobachteten Änderung der Regiospezifität führen. Die vorgenommenen Modifikationen des aktiven Zentrums von FgaPT2 hätten also nicht die direkte Prenylierung an Position C4 beeinflusst, sondern die Umlagerung des Prenylrests von Position C3 auf C4 verhindert und gleichzeitig die Umlagerung auf eine andere Position am Indolring begünstigt.

4.6 Aromatische Prenyltransferasen

Aromatische Prenyltransferasen tragen aufgrund der von ihnen katalysierten Reaktionen zu einer großen Diversität von aromatischen Naturstoffen bei, weshalb sie in den letzten Jahren intensiv erforscht wurden. Besondere Fortschritte konnten unter anderem im Bereich der löslichen Prenyltransferasen aus Bakterien und Pilzen erzielt werden. Durch molekularbiologische und biochemische Untersuchungen wurden bis heute über 35 Enzyme dieser Gruppe mit unterschiedlicher Substrat- und Regiospezifität charakterisiert, darunter stammen mehr als 20 aus Pilzen. Die meisten dieser Prenyltransferasen sind flexibel gegenüber ihren aromatischen Substraten und übertragen den Prenylrest an verschiedene Positionen (N1, C2, C3, C4, C5, C6 und C7) des Indols. Aus diesem Grund eignen sie sich gut als Werkzeuge zur chemoenzymatischen Synthese neuer prenylierter aromatischer Verbindungen. Dieses konnte in der Vergangenheit mehrfach demonstriert werden.

Erfolge konnten auch im Bereich der Strukturaufklärung dieser Enzyme verzeichnet werden. Im Laufe der letzten sechs Jahre wurden die Quartärstrukturen bakterieller Prenyltransferasen NphB und CloQ sowie pilzlicher Prenyltransferasen FgaPT2 und FtmPT1 publiziert und zeigten eine gemeinsame Architektur. Da Enzyme beider Gruppen keine signifikanten Ähnlichkeiten auf Aminosäurerebene zueinander aufweisen, war ihre gemeinsame Struktur in Form des Prenyltransferase-*barrels* überraschend. Aufgrund dieser Ergebnisse schien eine konvergente Entwicklung der beiden Gruppen von Prenyltransferasen in der Evolution unwahrscheinlich, vielmehr wurde ein gemeinsamer Ursprung vermutet (Metzger *et al.*, 2009). Neueste *in silico* Untersuchungen der aromatischen Prenyltransferasen auf Sequenzebene unterstützen diese Hypothese und fassen beide Enzymgruppen zu einer Superfamilie zusammen (Bonitz *et al.*, 2011).

Membrangebundene aromatische Prenyltransferasen unterscheiden sich von den oben beschriebenen löslichen Enzymen nicht nur durch ihre Lokalisation in der Zelle sondern auch

durch ihre Abhängigkeit von divalenten Metallionen. Ihre Aminosäuresequenzen enthalten konservierte aspartatreiche Motive und zeigen keine Ähnlichkeiten zu den Sequenzen löslicher Prenyltransferasen aus Bakterien und Pilzen. Ebenfalls sind bisher keine strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den bisher vorhandenen Modellen von UbiA und LePGT1 mit dem Prenyltransferase-*barrel* erkennbar. Bonitz *et al.* (2011) haben auch membrangebundene Prenyltransferasen in ihre Analysen einbezogen. Wie erwartet haben die Autoren auf Sequenzebene keine Verwandtschaft zwischen diesen und löslichen aromatischen Prenyltransferasen festgestellt, woraus sie auf eine konvergente Entwicklung dieser Enzyme in der Evolution geschlossen haben.

Sequenzvergleiche auf Aminosäureebene haben gezeigt, dass AuaA die Sequenz KDIxDxEDG enthält (Abbildung 3-10), die bisher als spezifisch für Flavonoid- und Homogenisat-Prenyltransferasen beschrieben wurde. Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass AuaA und Flavonoid-Prenyltransferasen denselben Ursprung haben und sich in einer späteren Phase der Evolution entwickelt haben als andere Mitglieder dieser Enzymgruppe. Es wäre denkbar, dass sie dadurch einige Eigenschaften teilen, wie zum Beispiel die Substratspezifität. Biochemische Untersuchungen der Akzeptanz von AuaA gegenüber einigen Flavonoiden widerlegte jedoch diese Hypothese.

5 Referenzen

- Akashi, T., Sasaki, K., Aoki, T., Ayabe, S. & Yazaki, K.** (2009). Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin. *Plant Physiol.* 149, 683-693
- Ammon, H. & Hunnius, C.** (2010). 10 ed., Hrsg.H. Ammon, p. 1368. Berlin, New York: de Gruyter
- Antranikian, G. & Jaeger, K. E.** (2006). Angewandte Mikrobiologie, Hrsg.G. Antranikian, pp. 207-216. Springer Berlin Heidelberg
- Ashby, M. N., Kutsunai, S. Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A. & Edwards, P. A.** (1992). COQ2 is a candidate for the structural gene encoding *para*-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J Biol Chem* 267, 4128-4136
- Augustiniak, H., Gerth, K., Hoefle, G., Irschik, H., Jansen, R., Kunze, B., Reichenbach, H., Steinmetz, H. & Trowitzsch-Kienast, W.** (1986). Preparation of aurachins and their use as antibiotics, 3520229
- Balibar, C. J., Howard-Jones, A. R. & Walsh, C. T.** (2007). Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nat. Chem. Biol.* 3, 584-592
- Benjamin, S. & Pandey, A.** (1998). *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast.* 14, 1069-1087
- Berdy, J.** (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* 58, 1-26
- Bhosle, M., Klingman, D., Aagren, M., Wisniewski, T. and Lee, W. C.** (2011). Human growth hormone treatment: synthesis of literature on product delivery systems and administration practices. *J Spec Pediatr Nurs.* 16, 50-63
- Birnboim, HC. & Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure of screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523
- Bonitz, T., Alva, V., Saleh, O., Lupas, A. N. & Heide, L.** (2011). Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS. One.* 6, e27336
- Bouhired, S., Weber, M., Kempf-Sontag, A., Keller, N. P. & Hoffmeister, D.** (2007). Accurate prediction of the *Aspergillus nidulans* terrequinone gene cluster boundaries using the transcriptional regulator LaeA. *Fungal. Genet. Biol* 44, 1134-1145
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brandt, W., Bräuer, L., Gunnewich, N., Kufka, J., Rausch, F., Schulze, D., Schulze, E., Weber, R., Zakharova, S. & Wessjohann, L.** (2009). Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes. *Phytochemistry* 70, 1758-1775

- Bräuer, L., Brandt, W., Schulze, D., Zakharova, S. & Wessjohann, L.** (2008). A structural model of the membrane-bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *Chembiochem* 9, 982-992
- Camp, D., Davis, R. A., Campitelli, M., Ebdon, J. & Quinn, R. J.** (2011). Drug-like properties: Guiding principles for the design of natural product libraries. *J Nat. Prod.* 75, 72-81
- Capon, R. J., Skene, C., Stewart, M., Ford, J., O'Hair, R. A. J., Williams, L., Lacey, E., Gill, J. H., Heiland, K. & Friedel, T.** (2003). Aspergillicins A-E: five novel depsipeptides from the marine-derived fungus *Aspergillus carneus*. *Org. Biomol. Chem.* 1, 1856-1862
- Chang, T. H., Guo, R. T., Ko, T. P., Wang, A. H. & Liang, P. H.** (2006). Crystal structure of type-III geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Saccharomyces cerevisiae* and the mechanism of product chain length determination. *J Biol. Chem* 281, 14991-15000
- Chen, X., Yang, L., Oppenheim, J. J. & Howard, M. Z.** (2002). Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. *Phytother. Res.* 16, 199-209
- Collakova, E. & DellaPenna, D.** (2001). Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 1113-1124
- Crowell, D. N. & Huizinga, D. H.** (2009). Protein isoprenylation: the fat of the matter. *Trends Plant Sci.* 14, 163-170
- Cui, C. B., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R., Ubukata, M., Takahashi, I., Isono, K. & Osada, H.** (1995). Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* 48, 1382-1384
- de la Campa, R., Seifert, K. & Miller, J. D.** (2007). Toxins from strains of *Penicillium chrysogenum* isolated from buildings and other sources. *Mycopathologia* 163, 161-168
- Ding, Y., Williams, R. M. & Sherman, D. H.** (2008). Molecular analysis of a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Malbranchea aurantiaca*. *J. Biol. Chem.* 283, 16068-16076
- Dorner, J. W.** (2002). Recent advances in analytical methodology for cyclopiazonic acid. *Adv. Exp. Med. Bio.* 504, 107-116
- Dunn, P. J.** (2011). The importance of Green Chemistry in Process Research and Development. *Chem.Soc.Rev.* 41, 1452-1461
- Efferth, T., Miyachi, H. & Bartsch, H.** (2007). Pharmacogenomics of a traditional Japanese herbal medicine (Kampo) for cancer therapy. *Cancer Genomics Proteomics* 4, 81-91
- Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A. & Dragoni, I.** (2001). Roquefortine C occurrence in blue cheese. *J. Food Prot.* 64, 246-251
- Floss, H. G.** (2006). Combinatorial biosynthesis--potential and problems. *J. Biotechnol.* 124, 242-257

- Fredenhagen, A., Petersen, F., Tintelnot-Blomley, M., Rosel, J., Mett, H. & Hug, P.** (1997). Semiochliodinol A and B: inhibitors of HIV-1 protease and EGF-R protein tyrosine kinase related to asterriquinones produced by the fungus *Chrysosporium merdarium*. *J. Antibiot.* 50, 395-401
- Fujihashi, M., Zhang, Y.-W., Higuchi, Y., Li, X.-Y., Koyama, T. & Miki, K.** (2001). Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 4337-4342
- Gallagher, R. T. & Latch, G. C. M.** (1977). Production of the tremorgenic mycotoxins verruculogen and fumitremorgin B by *Penicillium piscarium* Westling. *Appl. Envir. Microbiol.* 33, 730-731
- Ganesan, R., Eigenbrot, C. and Kirchhofer, D.** (2010). Structural and mechanistic insight into how antibodies inhibit serine proteases. *Biochem.J.* 430, 179-189
- Gavrilescu, M. & Chisti, Y.** (2005). Biotechnology-a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* 23, 471-499
- Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H., Frank, N., Bartsch, H. & Becker, H.** (2002). Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 959-969
- Gill, S. S. & Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem.* 48, 909-930
- Gopishetty, B., Ren, L., Waller, T. M., Wavreille, A. S., Lopez, M., Thakkar, A., Zhu, J. & Pei, D.** (2008). Synthesis of 3,5-difluorotyrosine-containing peptides: application in substrate profiling of protein tyrosine phosphatases. *Org. Lett.* 10, 4605-4608
- Grundmann, A., Kuznetsova, T., Afiyatullof, S. S. & Li, S.-M.** (2008). FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *Chembiochem* 9, 2059-2063
- Grundmann, A. & Li, S.-M.** (2005). Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 151, 2199-2207
- Guo, R. T., Ko, T. P., Chen, A. P., Kuo, C. J., Wang, A. H. & Liang, P. H.** (2005). Crystal structures of undecaprenyl pyrophosphate synthase in complex with magnesium, isopentenyl pyrophosphate, and farnesyl thiopyrophosphate: roles of the metal ion and conserved residues in catalysis. *J Biol Chem* 280, 20762-20774
- Hartkorn, A., Hoffmann, F., Ajamieh, H., Heilmann, J., Gerbes, A., Vollmar, A. & Zahler, S.** (2009). Antioxidant effects of xanthohumol and functional impact on hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Nat. Prod.* 72, 1741-1747
- Haug-Schifferdecker, E., Arican, D., Brueckner, R. & Heide, L.** (2010). A new group of aromatic prenyltransferases in fungi, catalyzing a 2,7-dihydroxynaphthalene dimethylallyltransferase reaction. *J. Biol. Chem.* 285, 16487-16494

- Hayashi, A., Fujioka, S., Nukina, M., Kawano, T., Shimada, A. & Kimura, Y.** (2007). Fumiquinones A and B, nematocidal quinones produced by *Aspergillus fumigatus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 1697-1702
- He, J., Wijeratne, E. M. K., Bashyal, B. P., Zhan, J., Seliga, C. J., Liu, M. X., Pierson, E. E., Pierson, L. S., VanEtten, H. D. & Gunatilaka, A. A. L.** (2004). Cytotoxic and other metabolites of *Aspergillus* inhabiting the rhizosphere of Sonoran desert plants. *J. Nat. Prod.* 67, 1985-1991
- Heide, L.** (2009a). Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 171-179
- Heide, L.** (2009b). The aminocoumarins: biosynthesis and biology. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1241-1250
- Höfle, G., Böhlendorf, B., Fecker, T., Sasse, F. & Kunze, B.** (2008). Semisynthesis and antiparasitic activity of the quinoline alkaloid aurachin E. *J. Nat. Prod.* 71, 1967-1969
- Hougland, J. L. & Fierke, C. A.** (2009). Getting a handle on protein prenylation. *Nat. Chem. Biol.* 5, 197-198
- Jain, H. D., Zhang, C., Zhou, S., Zhou, H., Ma, J., Liu, X., Liao, X., Deveau, A. M., Dieckhaus, C. M., Johnson, M. A., Smith, K. S., Macdonald, T. L., Kakeya, H., Osada, H. & Cook, J. M.** (2008). Synthesis and structure-activity relationship studies on tryprostatin A, a potent inhibitor of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 4626-4651
- Jost, M., Zocher, G., Tarcz, S., Matuschek, M., Xie, X., Li, S.-M. & Stehle, T.** (2010). Structure-function analysis of an enzymatic prenyl transfer reaction identifies a reaction chamber with modifiable specificity. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 17849-17858
- Kelly, D. J., Hughes, N. J. & Poole, R. K.** (2001). *Helicobacter pylori*, Hrsg. H. L. T. Mobley, G. L. Mendz, & S. L. Hazell, p. 116. Washington (DC): ASM Press
- Kennedy, J.** (2008). Mutasynthesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. *Nat. Prod. Rep.* 25, 25-34
- Kitagawa, W. & Tamura, T.** (2008). A quinoline antibiotic from *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824. *J. Antibiot. (Tokyo)* 61, 680-682
- Kito, Y. & Suzuki, H.** (2003). Electrophysiological properties of gastric pacemaker potentials. *J. Smooth Muscle Res.* 39, 163-173
- Koeduka, T., Shitan, N., Kumano, T., Sasaki, K., Sugiyama, A., Linley, P., Kawasaki, T., Ezura, H., Kuzuyama, T. & Yazaki, K.** (2011). Production of prenylated flavonoids in tomato fruits expressing a prenyltransferase gene from *Streptomyces coelicolor*. *Plant Physiol.* 13, 411-415
- Koeller, K. M. & Wong, C. H.** (2001). Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409, 232-240
- Kremer, A. & Li, S.-M.** (2008). Potential of a 7-dimethylallyltryptophan synthase as a tool for production of prenylated indole derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 951-961

- Kremer, A. & Li, S.-M.** (2010). A tyrosine O-prenyltransferase catalyses the first pathway-specific step in the biosynthesis of sirodesmin PL. *Microbiology* 156, 278-286
- Kremer, A., Westrich, L. & Li, S.-M.** (2007). A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization. *Microbiology* 153, 3409-3416
- Kumano, T., Richard, S. B., Noel, J. P., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T.** (2008). Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem* 16, 8117-8126
- Kunze, B., Höfle, G. & Reichenbach, H.** (1987). The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 40, 258-265
- Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B.** (2005). Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* 435, 983-987
- Li, S.-M.** (2009). Evolution of aromatic prenyltransferases in the biosynthesis of indole derivatives. *Phytochemistry* 70, 1746-1757
- Li, S.-M.** (2010). Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 27, 57-78
- Liang, P. H.** (2009). Reaction kinetics, catalytic mechanisms, conformational changes, and inhibitor design for prenyltransferases. *Biochemistry* 48, 6562-6570
- Liang, P. H., Ko, T. P. & Wang, A. H.** (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* 269, 3339-3354
- Losada, L., Ajayi, O., Frisvad, J. C., Yu, J. & Nierman, W. C.** (2009). Effect of competition on the production and activity of secondary metabolites in *Aspergillus* species. *Med. Mycol.* 47 Suppl 1, S88-S96
- Luk, L. Y., Qian, Q. & Tanner, M. E.** (2011). A cope rearrangement in the reaction catalyzed by dimethylallyltryptophan synthase? *J. Am. Chem. Soc.* 133, 12342-12345
- Lundblad, R. L., Bradshaw, R. A., Gabriel, D., Ortel, T. L., Lawson, J. and Mann, K. G.** (2004). A review of the therapeutic uses of thrombin. *Thromb Haemost.* 91, 851-860
- Ma, H. Y., Song, Y. C., Mao, Y. Y., Jiang, J. H., Tan, R. X. & Luo, L.** (2006). Endophytic fungal metabolite fumigaclavine C causes relaxation of isolated rat aortic rings. *Planta Med.* 72, 387-392
- Maurer-Stroh, S., Washietl, S. & Eisenhaber, F.** (2003). Protein prenyltransferases: anchor size, pseudogenes and parasites. *Biol. Chem.* 384, 977-989
- Melzer, M. & Heide, L.** (1994). Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1212, 93-102
- Metzger, U., Keller, S., Stevenson, C. E., Heide, L. & Lawson, D. M.** (2010). Structure and mechanism of the magnesium-independent aromatic prenyltransferase CloQ from the clorobiocin biosynthetic pathway. *J. Mol. Biol.* 404, 611-626

- Metzger, U., Schall, C., Zocher, G., Unsöld, I., Stec, E., Li, S.-M., Heide, L. & Stehle, T.** (2009). The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 14309-14314
- Moldes-Anaya, A., Rundberget, T., Uhlig, S., Rise, F. & Wilkins, A. L.** (2011). Isolation and structure elucidation of secopenitrem D, an indole alkaloid from *Penicillium crustosum* Thom. *Toxicon* 57, 259-265
- Monocoq, K., Trieber, C. A. & Young, H. S.** (2007). The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J. Biol. Inorg. Chem.* 282, 9748-9757
- Nachtigall, J., Schneider, K., Nicholson, G., Goodfellow, M., Zinecker, H., Imhoff, J. F., Süßmuth, R. D. & Fiedler, H. P.** (2010). Two new aurachins from *Rhodococcus* sp. *Acta 2259. J Antibiot (Tokyo)* 63, 567-569
- Ng, T., Ye, X., Wong, J., Fang, E., Chan, Y., Pan, W., Ye, X., Sze, S., Zhang, K., Liu, F. & Wang, H.** (2011). Glyceollin, a soybean phytoalexin with medicinal properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 90, 59-68
- Nguyen, U. T., Goody, R. S. & Alexandrov, K.** (2010). Understanding and exploiting protein prenyltransferases. *Chembiochem.* 11, 1194-1201
- Nowicka, B. & Kruk, J.** (2010). Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1587-1605
- Ohara, K., Muroya, A., Fukushima, N. & Yazaki, K.** (2009). Functional characterization of LePGT1, a membrane-bound prenyltransferase involved in the geranylation of p-hydroxybenzoic acid. *Biochem. J* 421, 231-241
- Ozaki, T., Mishima, S., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T.** (2009). NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J Antibiot. (Tokyo)* 62, 385-392
- Pedras, M. S., Yaya, E. E. & Glawischnig, E.** (2011). The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: chemistry and biology. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1381-1404
- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C. T., Li, S.-M. & Heide, L.** (2003). CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2316-2321
- Poulter, C. D.** (2006). Farnesyl diphosphate synthase. A paradigm for understanding structure and function relationships in E-polyprenyl diphosphate synthases. *Phytochem. Rev.* 5, 17-26
- Robertson, C. E., Black, D. F. & Swanson, J. W.** (2010). Management of migraine headache in the emergency department. *Semin. Neurol.* 30, 201-211
- Sabu, A.** (2003). Sources, properties and applications of microbial therapeutic enzymes. *Indian Journal of Biotechnology* 2, 334-341

- Sadre, R., Frentzen, M., Saeed, M. & Hawkes, T.** (2010). Catalytic reactions of the homogentisate prenyl transferase involved in plastoquinone-9 biosynthesis. *J Biol. Chem.* 285, 18191-18198
- Sambrook, J. & Russell, D. W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sandmann, A., Dickschat, J., Jenke-Kodama, H., Kunze, B., Dittmann, E. & Müller, R.** (2007). A Type II polyketide synthase from the gram-negative bacterium *Stigmatella aurantiaca* is involved in aurachin alkaloid biosynthesis. *Angew. Chem Int. Ed Engl.* 46, 2712-2716
- Saper, J. R. & Silberstein, S.** (2006). Pharmacology of dihydroergotamine and evidence for efficacy and safety in migraine. *Headache* 46 Suppl 4, S171-S181
- Sasaki, K., Mito, K., Ohara, K., Yamamoto, H. & Yazaki, K.** (2008). Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol.* 146, 1075-1084
- Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Yamamoto, H. & Yazaki, K.** (2011). Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*. *J. Biol. Chem.* 286, 24125-24134
- Schardl, C. L., Panaccione, D. G. & Tudzynski, P.** (2006). Ergot alkaloids--biology and molecular biology. *The Alkaloids, Chem. Biol.* 63, 45-86
- Schiff, P. L.** (2006). Ergot and its alkaloids. *Am. J. Pharma. Edu.* 70, 1-10
- Schledz, M., Seidler, A., Beyer, P. & Neuhaus, G.** (2001). A novel phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 involved in tocopherol biosynthesis. *FEBS Lett.* 499, 15-20
- Schneider, P., Weber, M. & Hoffmeister, D.** (2008). The *Aspergillus nidulans* enzyme TdiB catalyzes prenyltransfer to the precursor of bioactive asterriquinones. *Fungal. Genet. Biol.* 45, 302-309
- Scott, P. M. & Kennedy, B. P. C.** (1976). Analysis of blue cheese for roquefortine and other alkaloids from *Penicillium roqueforti*. *J. Agric. Food Chem.* 24, 865-868
- Shimizu, N., Koyama, T. & Ogura, K.** (1998). Molecular cloning, expression, and purification of undecaprenyl diphosphate synthase. No sequence similarity between E- and Z-prenyl diphosphate synthases. *J. Biol. Chem.* 273, 19476-19481
- Silakowski, B., Kunze, B. & Müller, R.** (2000). *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 carries genes encoding type I and type II 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthases: involvement of a type II synthase in aurachin biosynthesis. *Arch Microbiol* 173, 403-411
- Sinensky, M.** (2000). Functional aspects of polyisoprenoid protein substituents: roles in protein-protein interaction and trafficking. *Biochim. Biophys Acta* 1529, 203-209
- Stec, E. and Li, S.-M.** (2012). Mutagenesis and biochemical studies on AuaA confirmed the importance of the two conserved aspartate-rich motifs and suggested difference in the amino acids for substrate binding in membrane-bound prenyltransferases. *Arch Microbiol* DOI: 10.1007/s00203-012-0795-0

- Stec, E., Pistorius, D., Müller, R. & Li, S.-M.** (2011). AuaA, a membrane-bound farnesyltransferase from *Stigmatella aurantiaca*, catalyzes the prenylation of 2-methyl-4-hydroxyquinoline in the biosynthesis of aurachins. *Chembiochem* 12, 1724-1730
- Stec, E., Steffan, N., Kremer, A., Zou, H., Zheng, X. & Li, S.-M.** (2008). Two Lysine residues are responsible for the enzymatic activities of indole prenyltransferases from fungi. *Chembiochem* 9, 2055-2058
- Steffan, N., Grundmann, A., Yin, W.-B., Kremer, A. & Li, S.-M.** (2009). Indole prenyltransferases from fungi: a new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives. *Curr. Med. Chem.* 16, 218-231
- Steffan, N. & Li, S.-M.** (2009). Increasing structure diversity of prenylated diketopiperazine derivatives by using a 4-dimethylallyltryptophan synthase. *Arch. Microbiol.* 191, 461-466
- Steffan, N., Unsöld, I. A. & Li, S.-M.** (2007). Chemoenzymatic synthesis of prenylated indole derivatives by using a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* 8, 1298-1307
- Steffensky, M., Mühlenweg, A., Wang, Z.-X., Li, S.-M. & Heide, L.** (2000). Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1214-1222
- Stocking, E. M., Williams, R. M. & Sanz-Cervera, J. F.** (2000). Reverse prenyl transferases exhibit poor facial discrimination in the biosynthesis of paraherquamide A, brevianamide A, and austamide. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 9089-9098
- Strickland, J. R., Looper, M. L., Matthews, J. C., Rosenkrans, C. F., Jr., Flythe, M. D. & Brown, K. R.** (2011). Board-invited review: St. Anthony's Fire in livestock: Causes, mechanisms, and potential solutions. *J. Anim. Sci.* 89, 1603-1626
- Süssmuth, R., Müller, J., von Döhren, H. & Molnar, I.** (2011). Fungal cyclooligomer depsipeptides: from classical biochemistry to combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 28, 99-124
- Suvarna, K., Stevenson, D., Meganathan, R. & Hudspeth, M. E.** (1998). Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: localization and characterization of the menA gene from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 2782-2787
- Takahashi, S. & Koyama, T.** (2006). Structure and function of cis-prenyl chain elongating enzymes. *Chem Rec.* 6, 194-205
- Takahashi, S., Takagi, H., Toyoda, A., Uramoto, M., Nogawa, T., Ueki, M., Sakaki, Y. & Osada, H.** (2010). Biochemical characterization of a novel indole prenyltransferase from *Streptomyces* sp. SN-593. *J. Bacteriol.* 192, 2839-2851
- Tarshis, L. C., Yan, M., Poulter, C. D. & Sacchettini, J. C.** (1994). Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6-Å resolution. *Biochemistry* 33, 10871-10877
- Tello, M., Kuzuyama, T., Heide, L., Noel, J. P. & Richard, S. B.** (2008). The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 1459-1463

- Tielens, S., Wymeersch, F., Declercq, H. & Cornelissen, M.** (2008). Effect of 17 β -estradiol on the in vitro differentiation of murine embryonic stem cells into the osteogenic lineage. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 44, 368-378
- Tsai, H. F., Wang, H., Gebler, J. C., Poulter, C. D. & Schardl, C. L.** (1995). The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 119-125
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M.** (2005). Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 151, 1499-1505
- Unsöld, I. A. & Li, S.-M.** (2006). Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem* 7, 158-164
- Usui, T., Kondoh, M., Cui, C. B., Mayumi, T. & Osada, H.** (1998). Tryprostatin A, a specific and novel inhibitor of microtubule assembly. *Biochem. J.* 333, 543-548
- van Beilen, J. B. & Li, Z.** (2002). Enzyme technology: an overview. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 338-344
- Vleggaar, R., Horak, R. M. & Maharaj, V. J.** (1993). Stereochemical course of ring formation in fumitremorgin B and verruculogen, metabolites of *Penicillium verruculosum*: investigation into the loss of stereochemical integrity of the geminal methyl groups. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 274-275
- Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Nozawa, K., Okada, K., Takaki, G. M. d. C., Yaguchi, T., Fukushima, K. & Kawai, K. I.** (2006). Isolation of isoterrein from *Neosartorya fischeri*. *Mycotoxins* 56, 3-6
- Wallwey, C. & Li, S.-M.** (2011). Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.* 28, 496-510
- Wallwey, C., Matuschek, M. & Li, S.-M.** (2010). Ergot alkaloid biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: conversion of chanoclavine-I to chanoclavine-I aldehyde catalyzed by a short-chain alcohol dehydrogenase FgaDH. *Arch. Microbiol.* 192, 127-134
- Walsh, T.** (2003). Where will new antibiotics come from? *Nat. Rev. Microb.* 1, 65-70
- Weissman, K. J.** (2007). Mutasynthesis - uniting chemistry and genetics for drug discovery. *Trends Biotechnol.* 25, 139-142
- Wenzel, S. C. & Muller, R.** (2007). Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating examples of curious biochemistry. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1211-1224
- Williams, R. M., Stocking, E. M. & Sanz-Cervera, J. F.** (2000). Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Topics Curr. Chem.* 209, 97-173
- Woehlecke, H., Osada, H., Herrmann, A. & Lage, H.** (2003). Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A. *Int. J. Cancer* 107, 721-728
- Woodside, A. B., Huang, Z. & Poulter, C. D.** (1988). Trisammonium geranyl diphosphate. *Org. Synth.* 66, 211-215

- Wu, X.-F., Fei, M.-J., Shu, R.-G., Tan, R.-X. & Xu, Q.** (2005). Fumigaclavine C, an fungal metabolite, improves experimental colitis in mice via downregulating Th1 cytokine production and matrix metalloproteinase activity. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1543-1553
- Wu, Z., Guo, X. & Guo, Z.** (2010). Chemoenzymatic synthesis of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycopeptides. *Chem. Commun. (Camb).* 46, 5773-5774
- Yazaki, K., Kuniyama, M., Fujisaki, T. & Sato, F.** (2002). Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277, 6240-6246
- Yazaki, K., Sasaki, K. & Tsurumaru, Y.** (2009). Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry* 70, 1739-1745
- Yin, W.-B., Grundmann, A., Cheng, J. & Li, S.-M.** (2009). Acetylaszonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri*: Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation. *J. Biol. Chem.* 284, 100-109
- Yin, W.-B., Ruan, H.-L., Westrich, L., Grundmann, A. & Li, S.-M.** (2007). CdpNPT, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterisation. *Chembiochem* 8, 1154-1161
- Yin, W.-B., Yu, X., Xie, X.-L. & Li, S.-M.** (2010). Preparation of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying a β -configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using a recombinant prenyltransferase CdpC3PT. *Org. Biomol. Chem.* 8, 2430-2438
- Yu, H., Thon, V., Lau, K., Cai, L., Chen, Y., Mu, S., Li, Y., Wang, P. G. & Chen, X.** (2010). Highly efficient chemoenzymatic synthesis of β -1-3-linked galactosides. *Chem. Commun. (Camb).* 46, 7307-7509
- Yu, X. & Li, S.-M.** (2011a). Prenylation of Flavonoids by Using a Dimethylallyltryptophan Synthase, 7-DMATS, from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* 12, 1-4
- Yu, X. & Li, S.-M.** (2011b). Prenylation of flavonoids by using a dimethylallyltryptophan synthase 7-DMATS from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* 12, 2280-2283
- Yu, X., Liu, Y., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M.** (2012). Biochemical characterization of indole prenyltransferases: Filling the last gap of prenylation positions by a 5-dimethylallyl tryptophansynthase from *Aspergillus clavatus*. *J. Biol. Chem.* 287, 1371-1380
- Yu, X., Xie, X. & Li, S.-M.** (2011). Substrate promiscuity of secondary metabolite enzymes: prenylation of hydroxynaphthalenes by fungal indole prenyltransferases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 737-748
- Zhao, S., Smith, K. S., Deveau, A. M., Dieckhaus, C. M., Johnson, M. A., Macdonald, T. L. & Cook, J. M.** (2002). Biological activity of the tryprostatins and their diastereomers on human carcinoma cell lines. *J. Med. Chem.* 45, 1559-1562
- Zhao, Y., Liu, J., Wang, J., Wang, L., Yin, H., Tan, R. & Xu, Q.** (2004). Fumigaclavine C improves concanavalin A-induced liver injury in mice mainly via inhibiting TNF- α production and lymphocyte adhesion to extracellular matrices. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 775-782

Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J. L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* 32, e115

Zimmermann, M. C., Tilghman, S. L., Boue, S. M., Salvo, V. A., Elliot, S., Williams, K. Y., Skripnikova, E. V., Ashe, H., Payton-Steward, F., Vanhoy-Rhodes, L., Fonseca, J. P., Corbitt, C., Collins-Burow, B. M., Howell, M. H., Lacey, M., Shih, B. Y., Carter-Wientjes, C., Cleveland, T. E., McLachlan, J. A., Wiese, T. E., Beckman, B. S. & Burow, M. E. (2010). Glyceollin I, a novel antiestrogenic phytoalexin isolated from activated soy. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 332, 35-45

Zou, H., Zheng, X. & Li, S.-M. (2009). Substrate promiscuity of the cyclic dipeptide prenyltransferases from *Aspergillus fumigatus*. *J. Nat. Prod.* 72, 44-52

Zou, H.-X., Xie, X.-L., Linne, U., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2010). Simultaneous C7- and N1-prenylation of cyclo-L-Trp-L-Trp catalyzed by a prenyltransferase from *Aspergillus oryzae*. *Org. Biomol. Chem.* 8, 3037-3044

6 Anhang

6.1 NMR-Spektren aus der GPP-Synthese

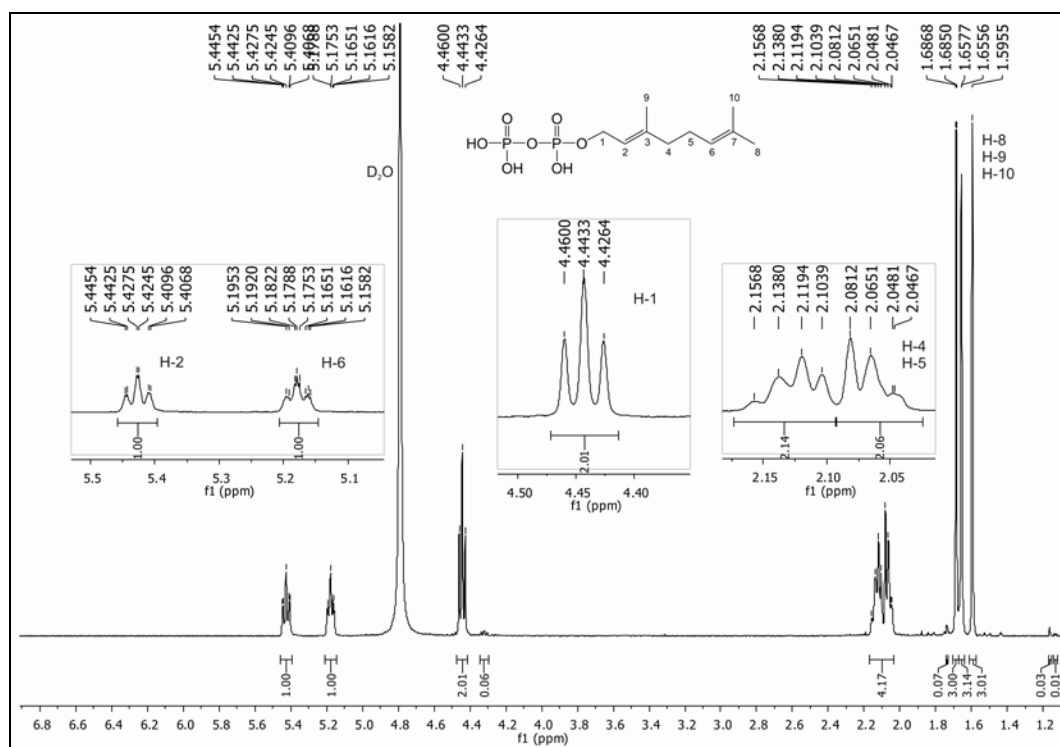


Abbildung 6-1: ^1H -NMR Spektrum der Fraktion 1 von GPP in D_2O (400 MHz).

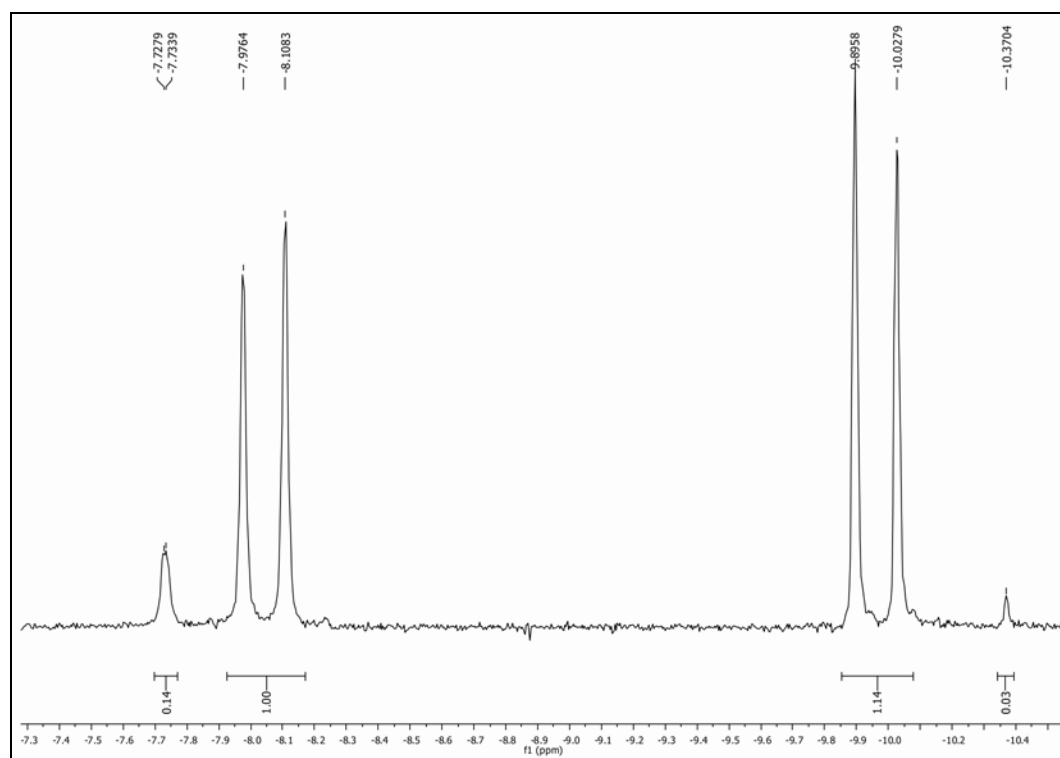


Abbildung 6-2: ^{31}P -NMR Spektrum der Fraktion 1 von GPP in D_2O (160 MHz).

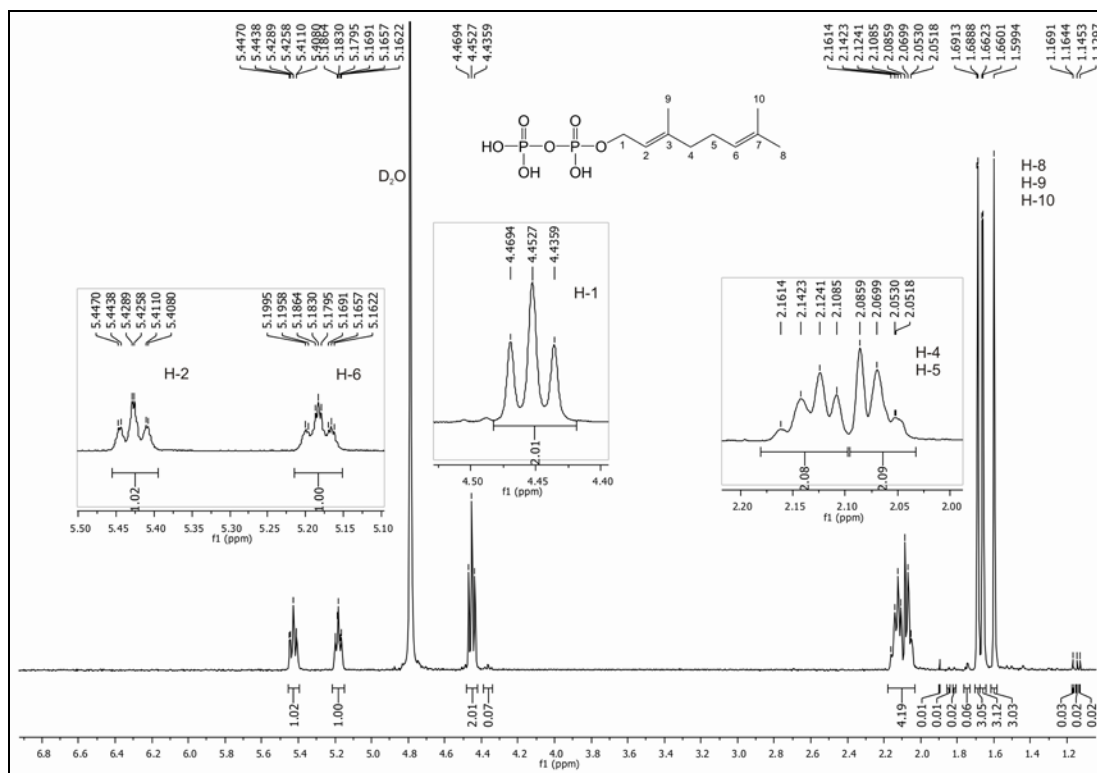


Abbildung 6-3: ^1H -NMR Spektrum der Fraktion 2 von GPP in D_2O (400 MHz).

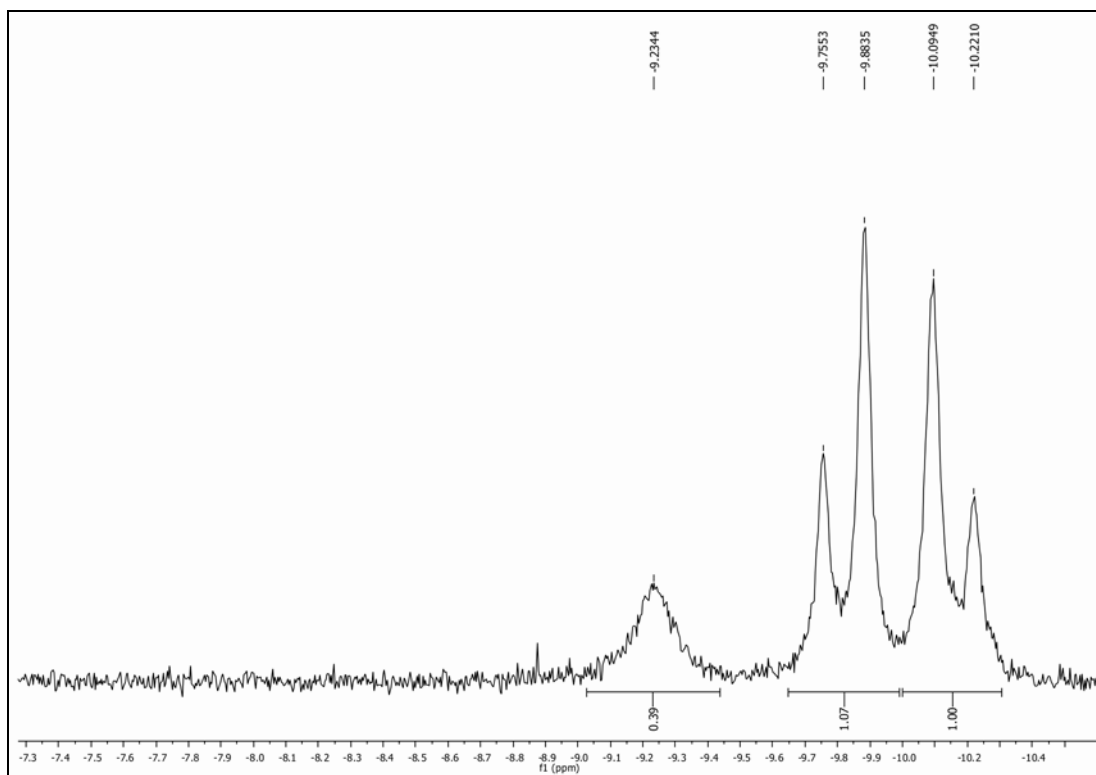


Abbildung 6-4: ^{31}P -NMR Spektrum der Fraktion 2 von GPP in D_2O (160 MHz).

Abbildung 6-6: ^{31}P -NMR Spektrum der Fraktion 1 von FPP in D_2O (200 MHz).

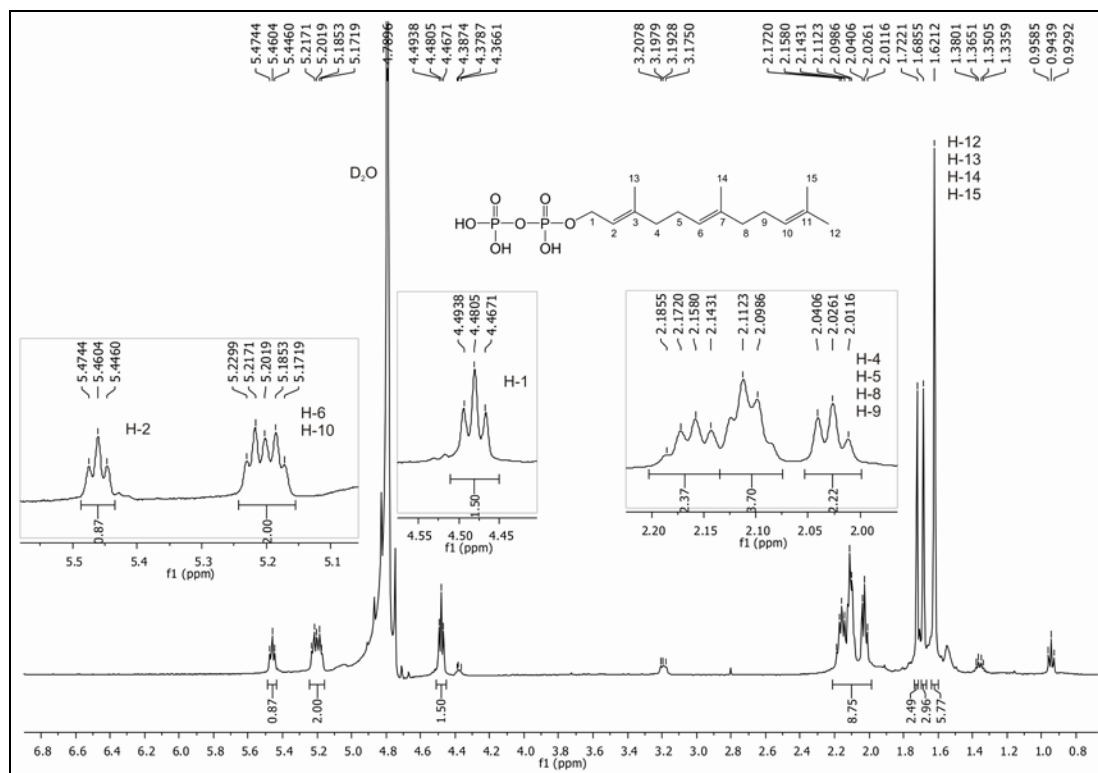


Abbildung 6-7: ^1H -NMR Spektrum der Fraktion 2 von FPP in D_2O (500 MHz).

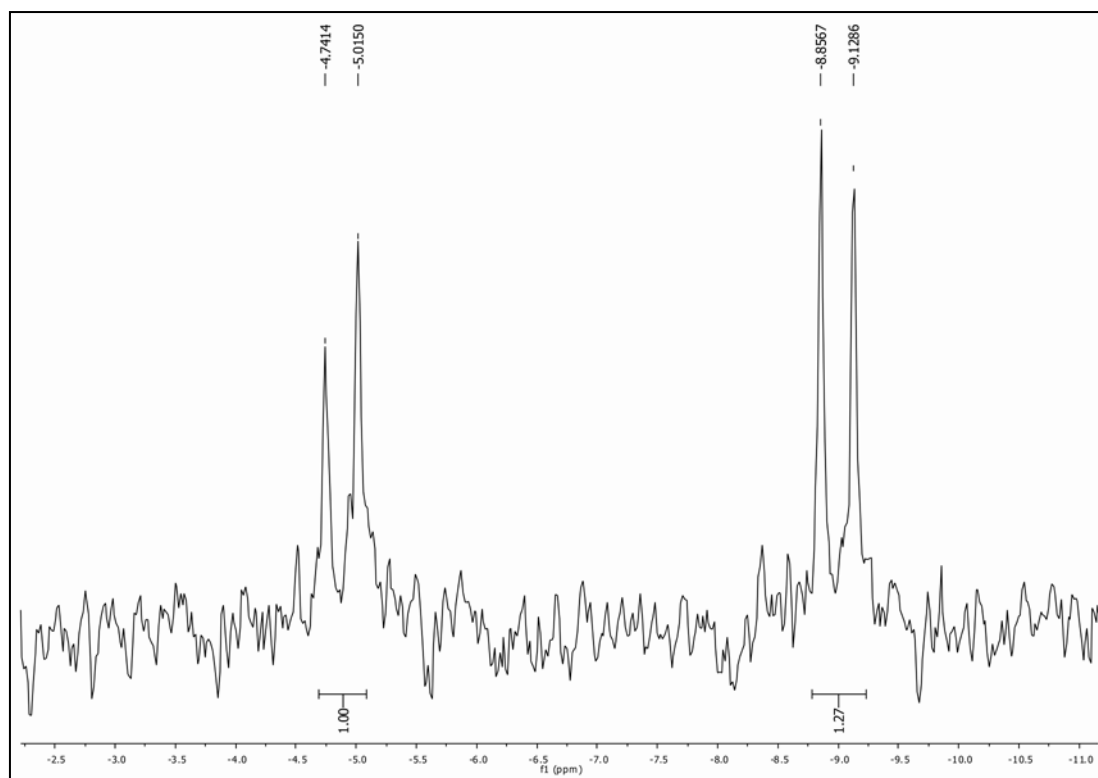


Abbildung 6-8: ^{31}P -NMR Spektrum der Fraktion 2 von FPP in D_2O (200 MHz).

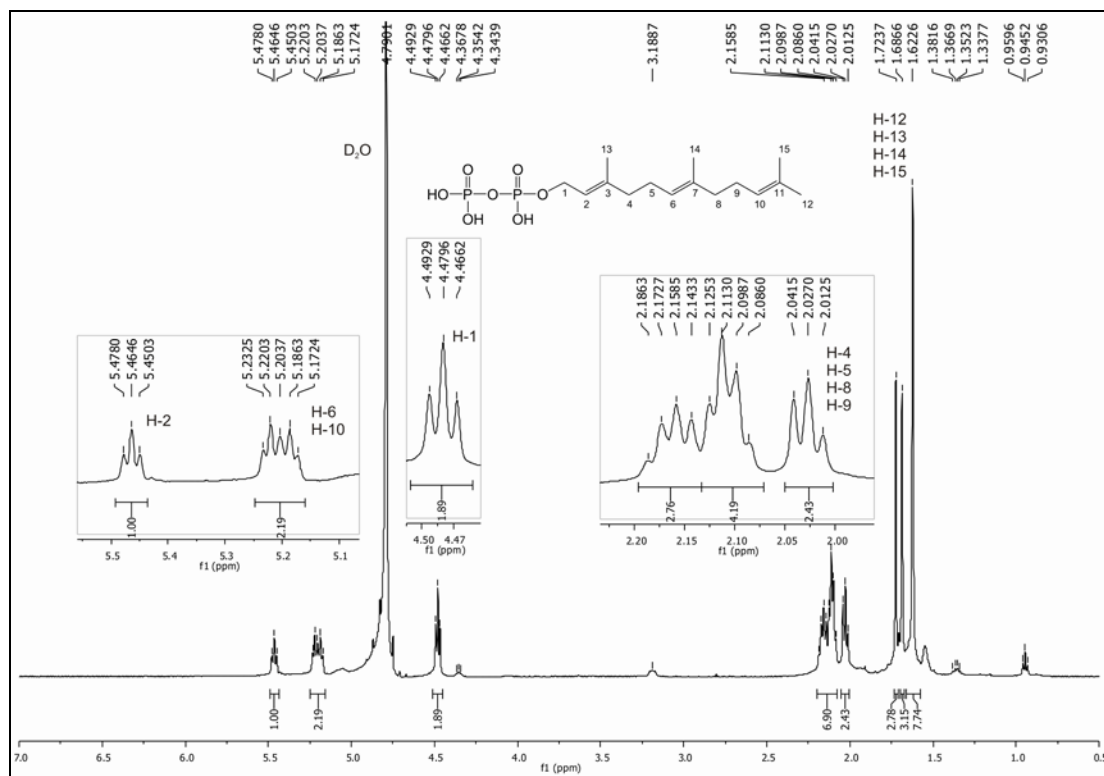


Abbildung 6-9: ¹H-NMR Spektrum der Fraktion 3 von FPP in D₂O (500 MHz).

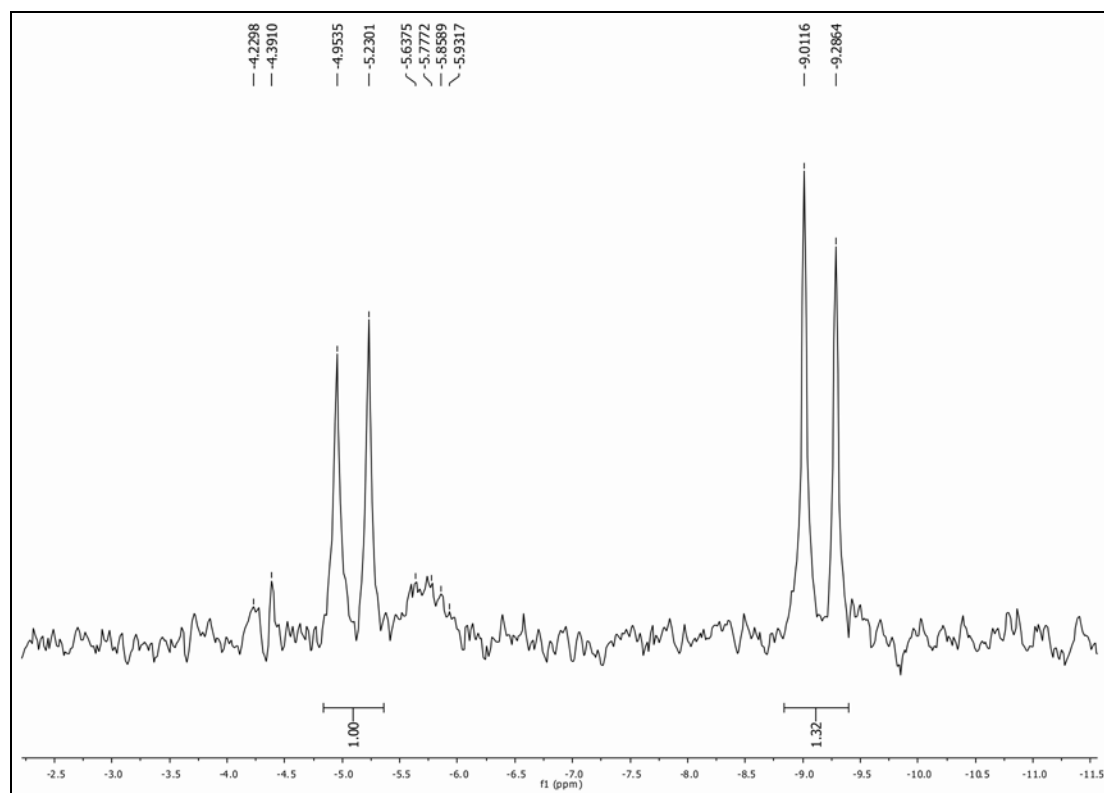


Abbildung 6-10: ³¹P-NMR Spektrum der Fraktion 3 von FPP in D₂O (200 MHz).

6.3 LC-MS-Analyse des enzymatischen Produktes von AuaA nach Inkubation mit 2-Methyl-4-Hydroxychinolin und FPP und Vergleich mit Aurachin D als Standard

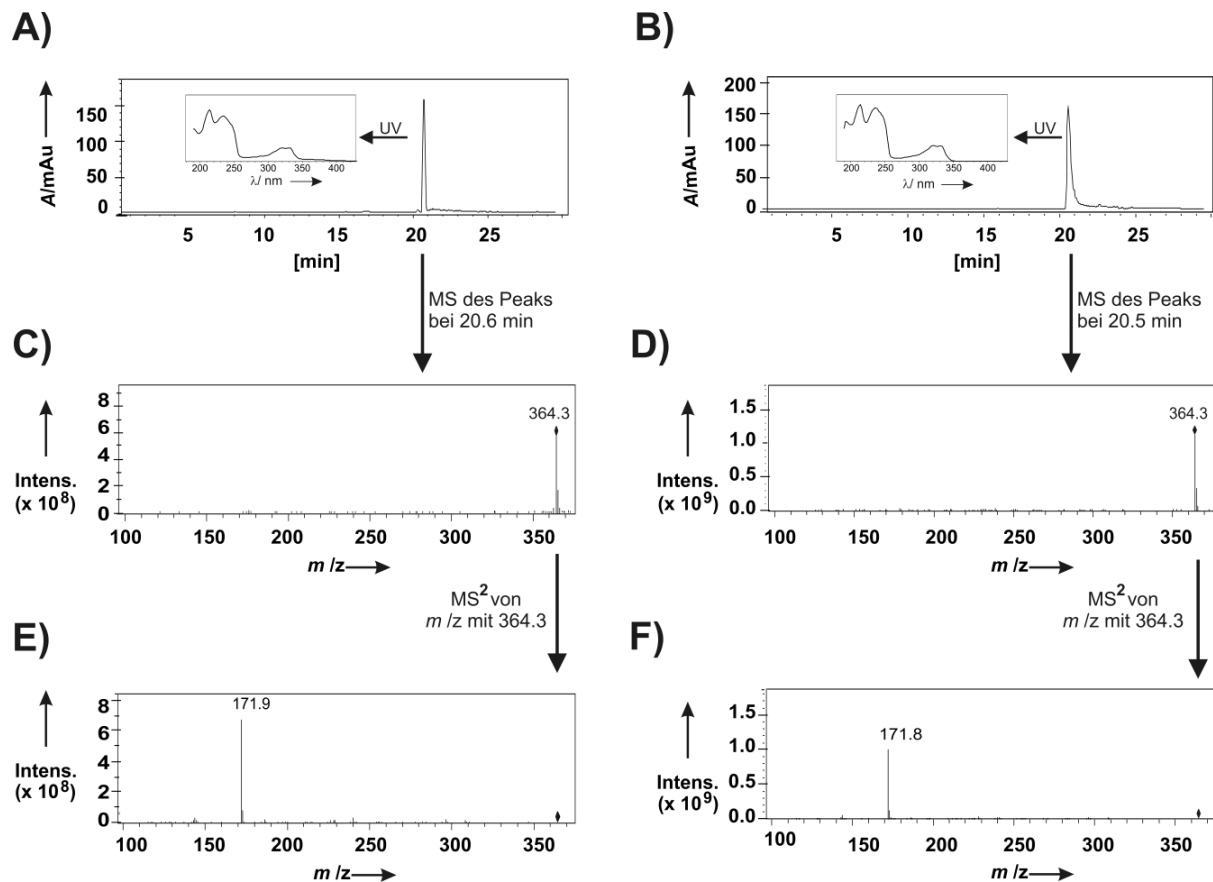


Abbildung 6-11: LC-MS-Analyse und Identifizierung von Aurachin D im AuaA-Aktivitätsassay. A) EI-Chromatogramm (für m/z 364.2 ± 0.3) des Aurachin D-haltigen Kulturextraktes aus *S. aurantiaca*, B) EI-Chromatogramm (für m/z 364.2 ± 0.3) des Aktivitätsassays mit AuaA und 2-Methyl-4-Hydroxychinolin, C) MS-Spektrum des Peaks bei 20.6 min aus dem Kulturextrakt von *S. aurantiaca*, D) MS-Spektrum des Peaks bei 20.5 min aus dem AuaA-Aktivitätsassay, E) MS/MS von Aurachin D bei m/z 364.3, F) MS/MS des Enzymproduktes im AuaA-Assay.

6.4 Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA

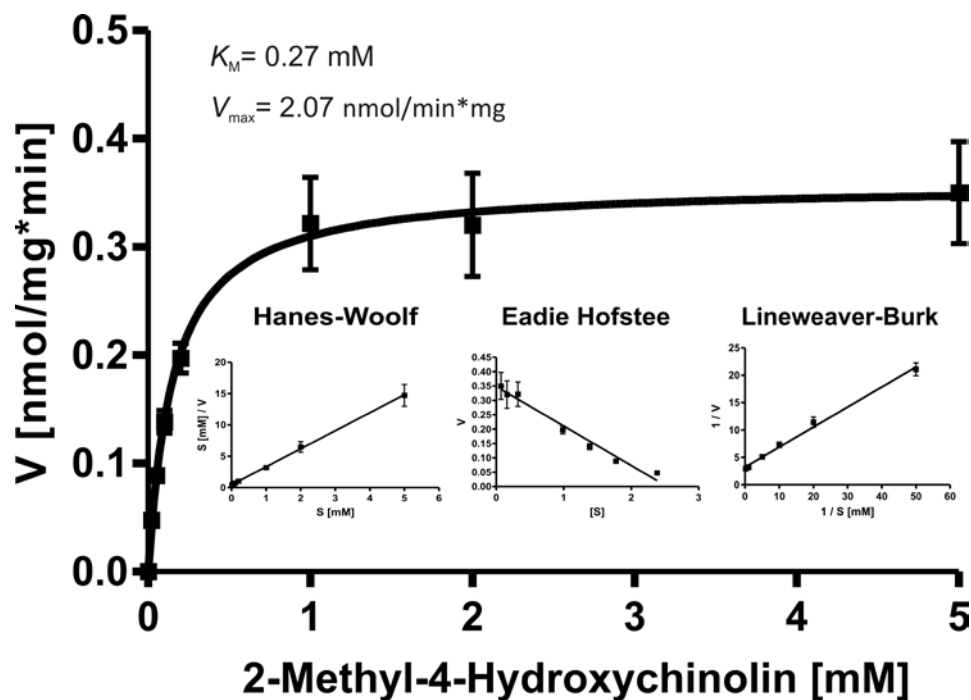


Abbildung 6-12: Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA gegenüber 2-Methyl-4-Hydroxyquinolin in Anwesenheit von 0.5 mM FPP.

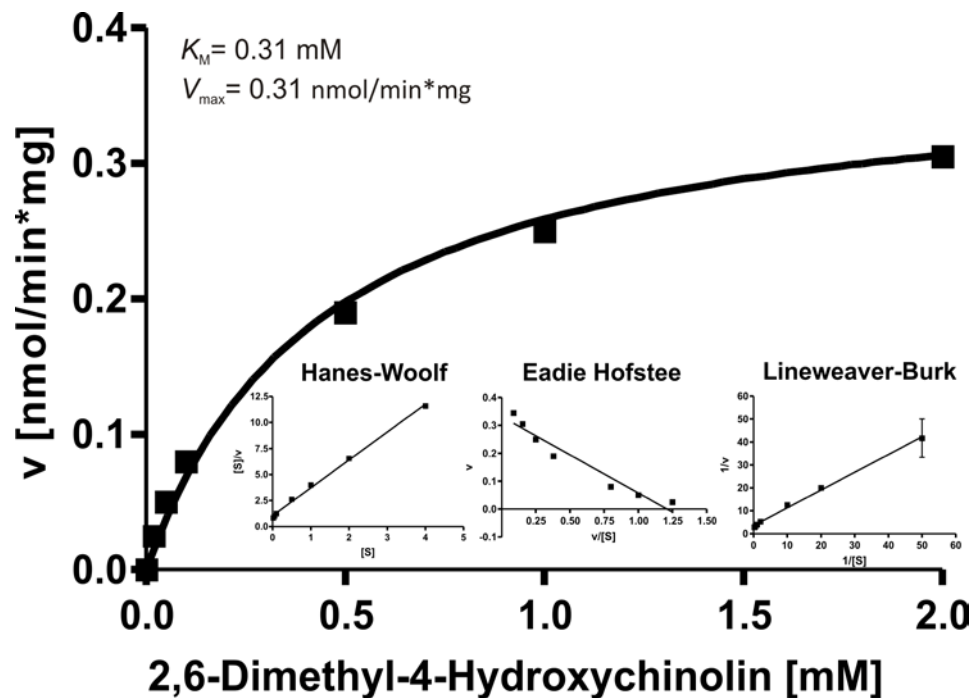


Abbildung 6-13: Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA gegenüber 2,6-Dimethyl-4-Hydroxyquinolin in Anwesenheit von 0.5 mM FPP.

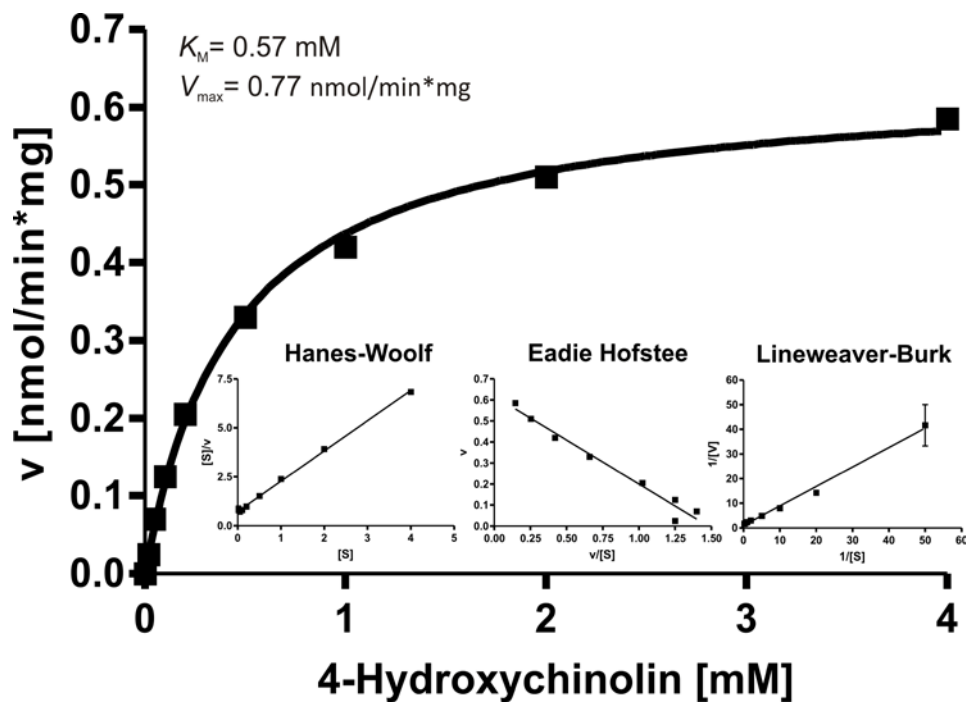


Abbildung 6-14: Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA gegenüber 4-Hydroxychinolin in Anwesenheit von 0.5 mM FPP.

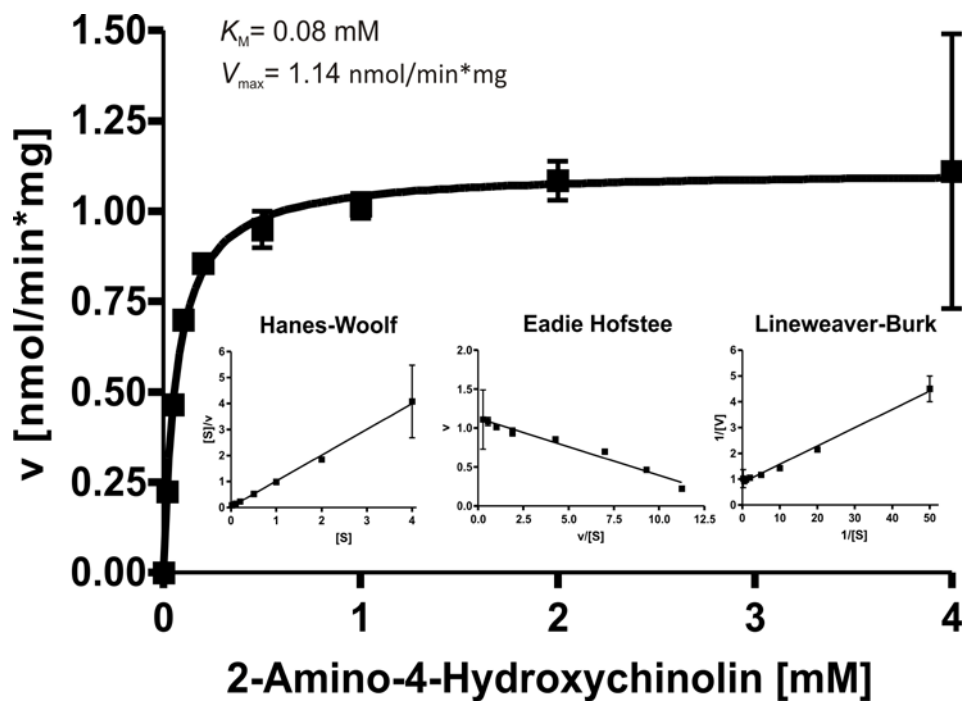


Abbildung 6-15: Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA gegenüber 2-Amino-4-Hydroxychinolin in Anwesenheit von 0.5 mM FPP.

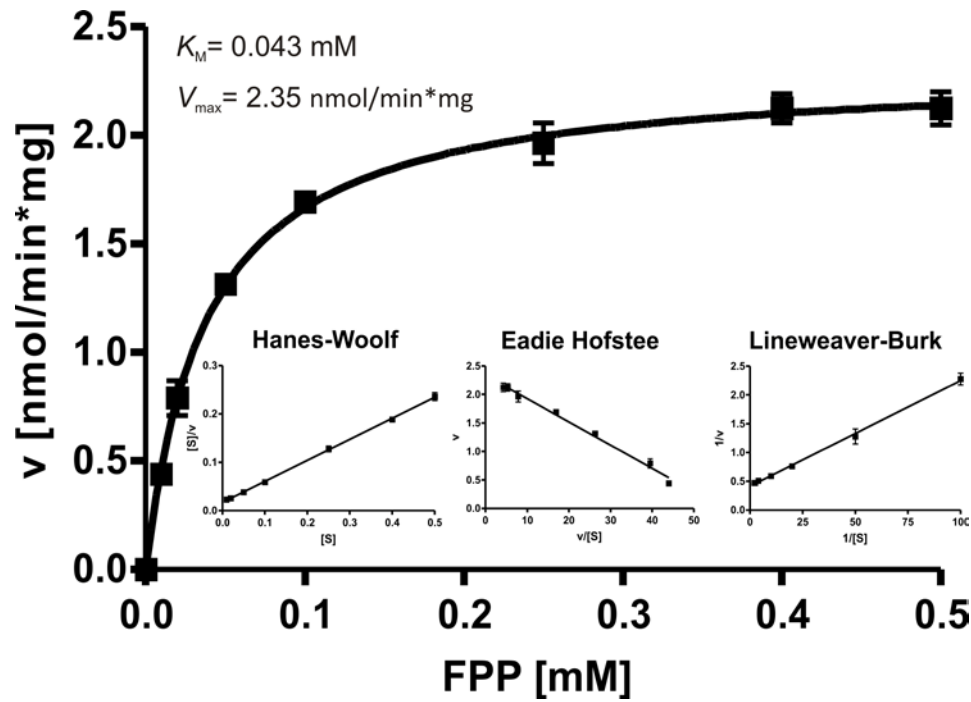


Abbildung 6-16: Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA gegenüber FPP in Anwesenheit von 2 mM 2-Methyl-4-Hydroxychinolin.

6.5 Spektren der enzymatischen Produkte von AuaA

6.5.1 2-Methyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin (Aurachin D)

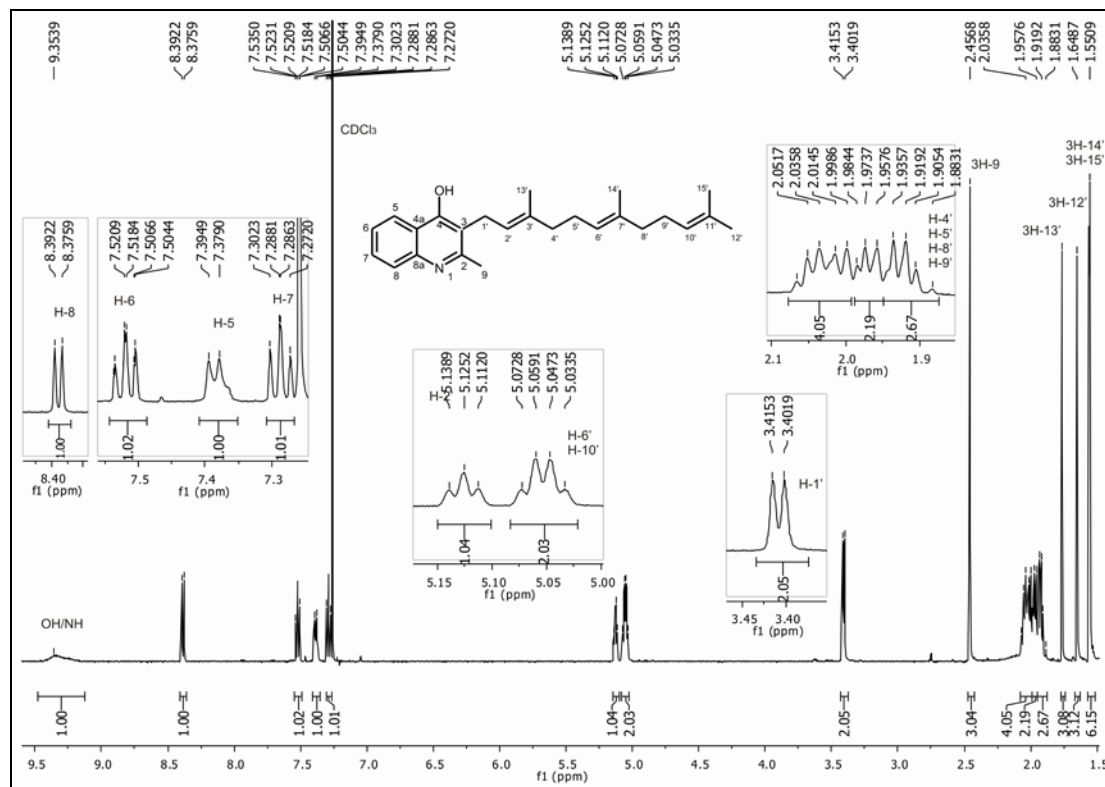


Abbildung 6-17: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2-Methyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin in CDCl_3 (500 MHz).

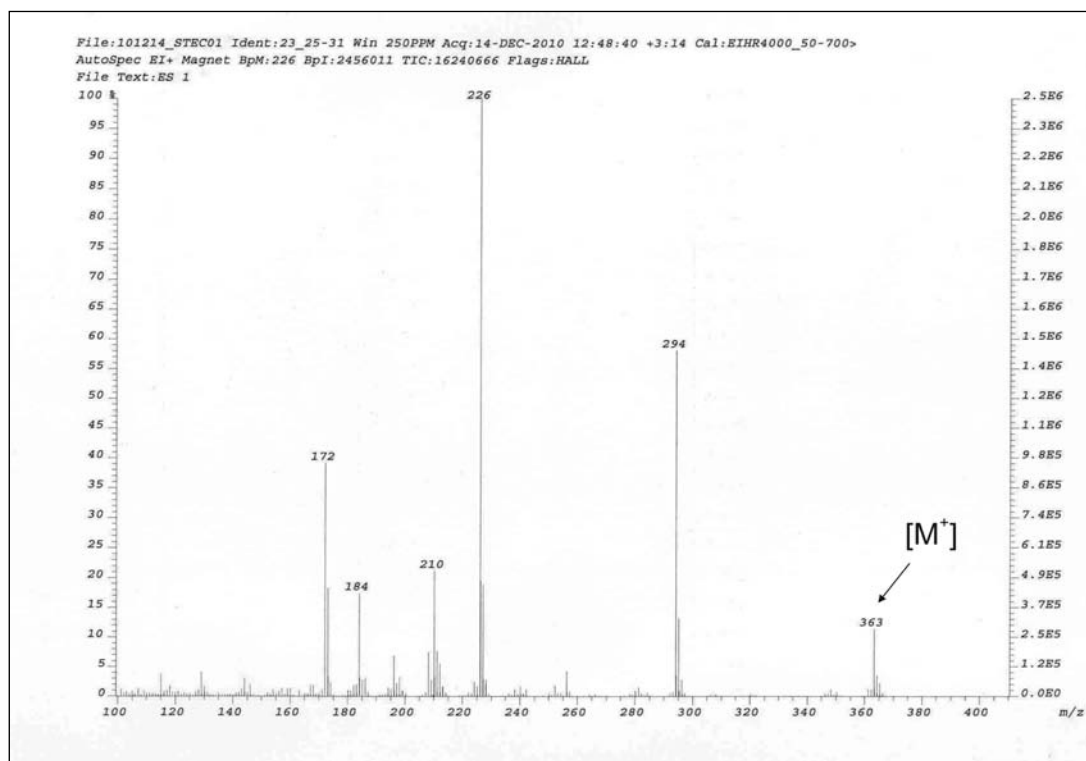
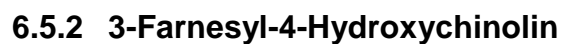


Abbildung 6-18: EI-MS von 2-Methyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin.



6.5.3 2-Amino-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin

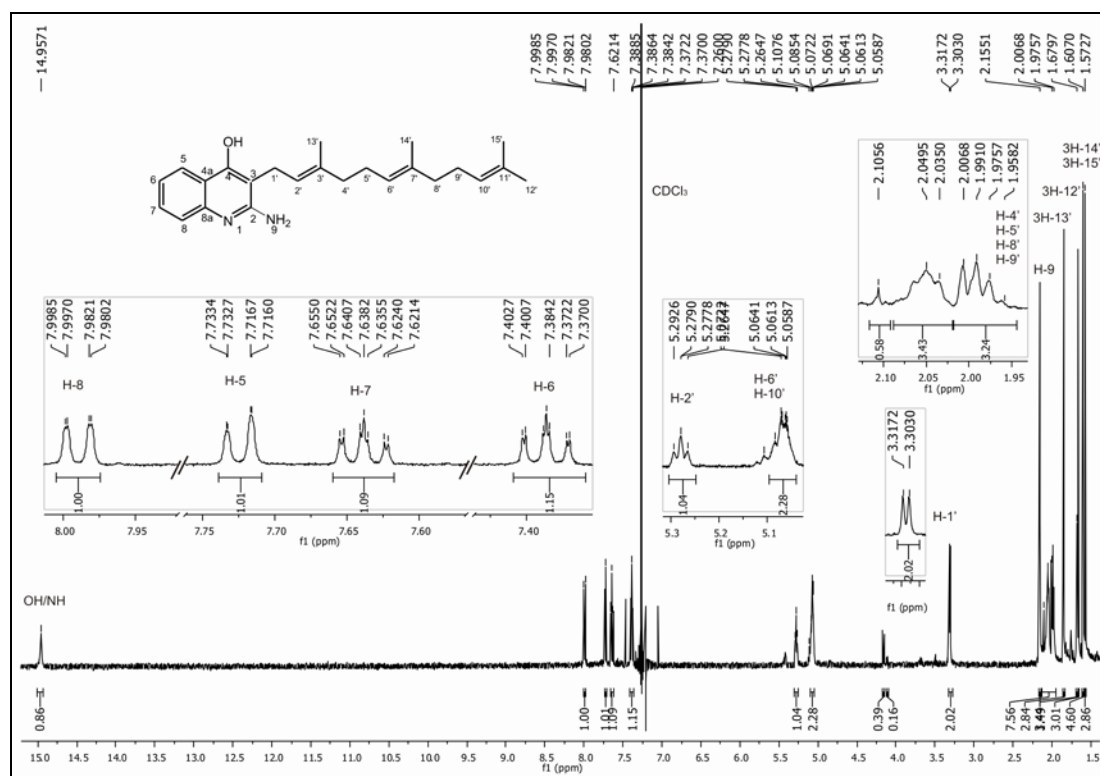
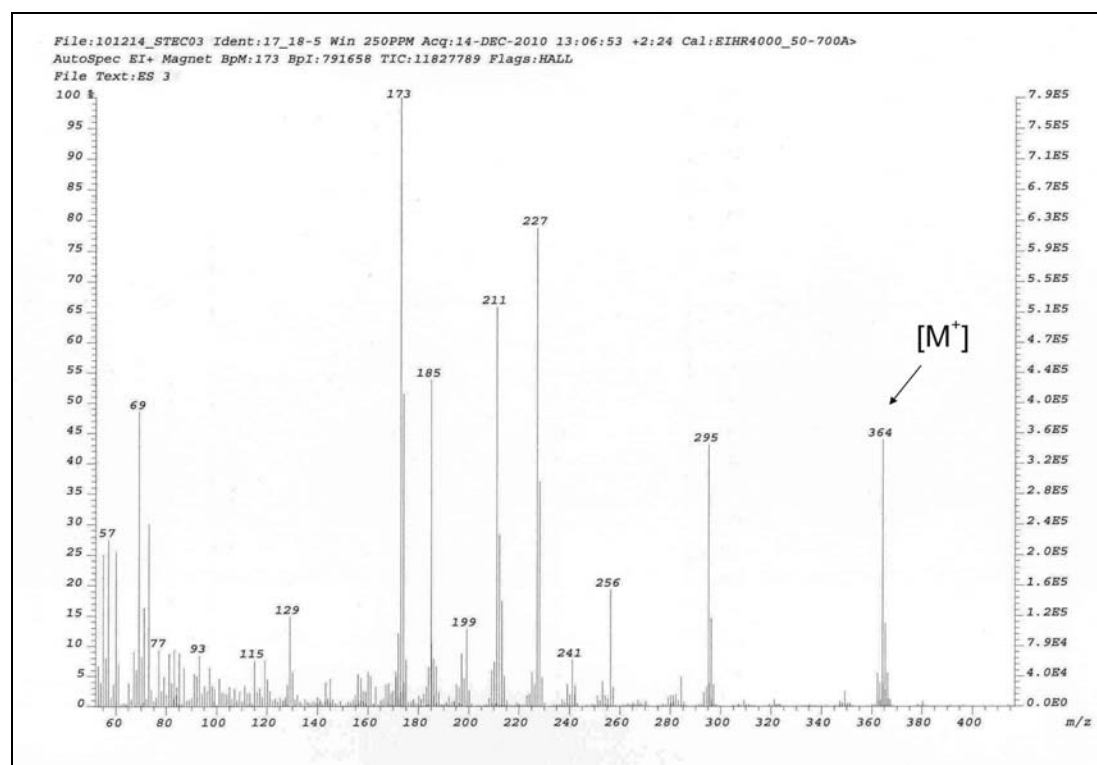
Abbildung 6-21: ^1H -NMR Spektrum von 2-Amino-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin in CDCl_3 (500 MHz).

Abbildung 6-22: EI-MS von 2-Amino-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin.

6.5.4 3-Farnesyl-4-Hydroxy-7-Chloroquinolin

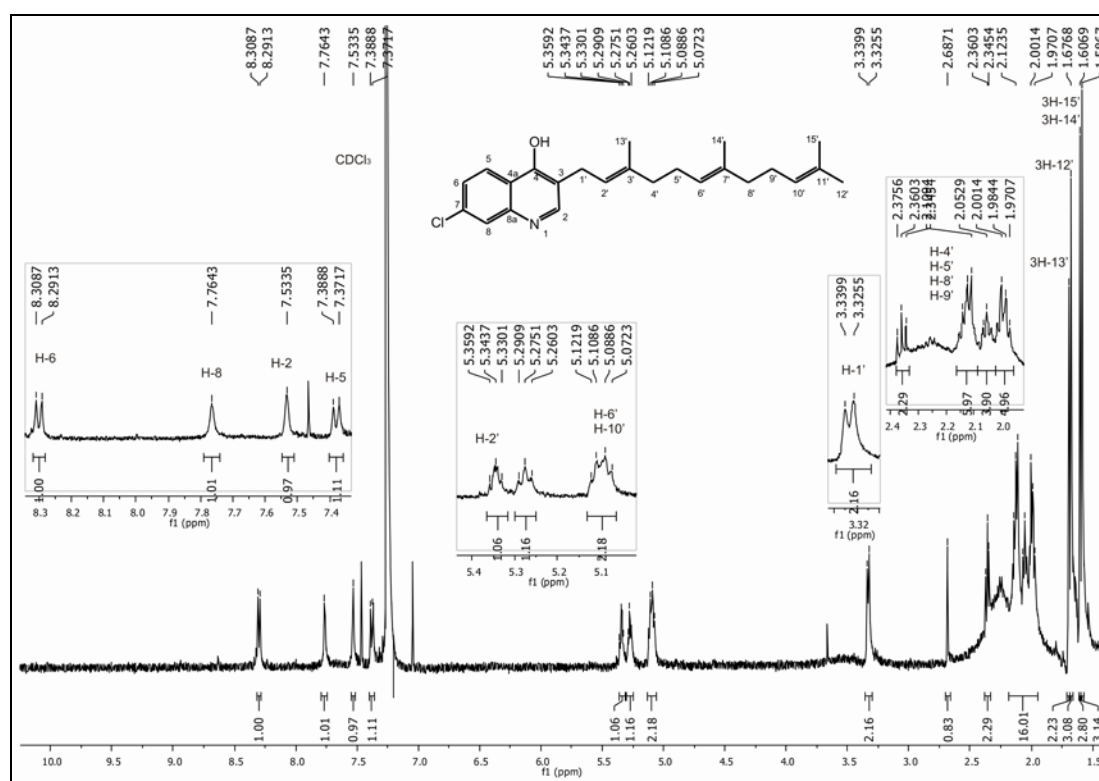
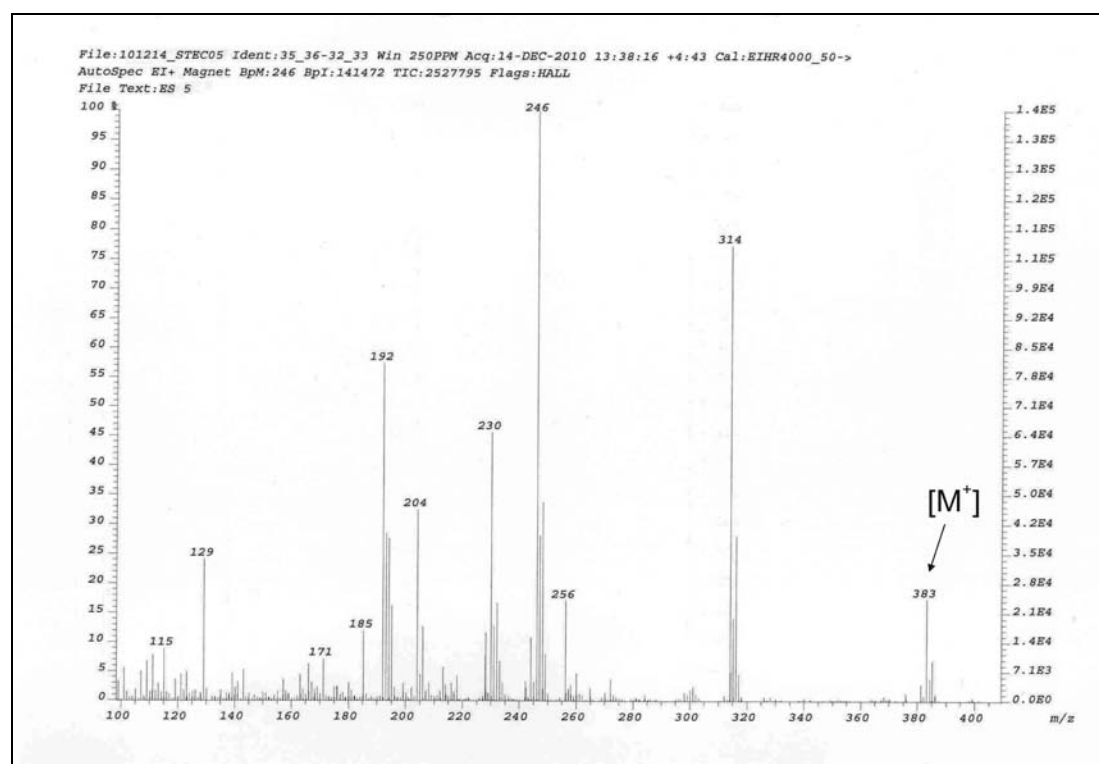
Abbildung 6-23: ^1H -NMR Spektrum von 3-Farnesyl-4-Hydroxy-7-Chloroquinolin in CDCl_3 (500 MHz).

Abbildung 6-24: EI-MS von 3-Farnesyl-4-Hydroxy-7-Chloroquinolin.

6.5.5 2,6-Dimethyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin

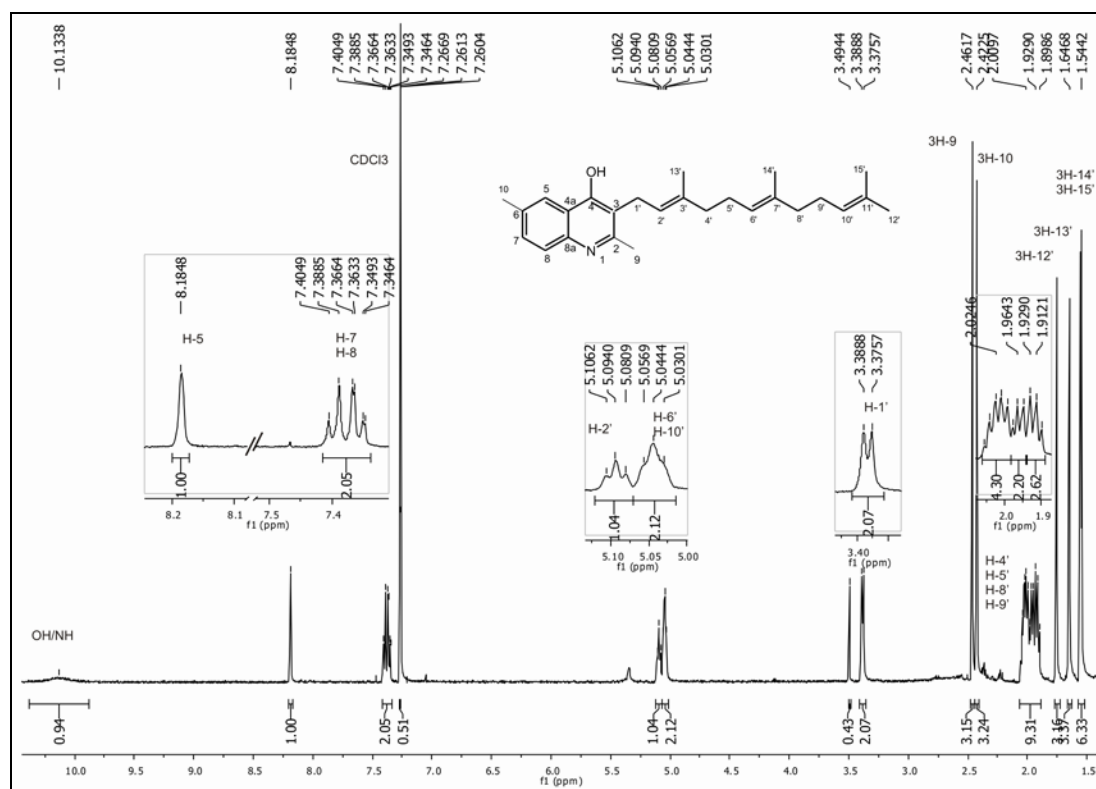


Abbildung 6-25: ^1H -NMR Spektrum von 2,6-Dimethyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin in CDCl_3 (500 MHz).

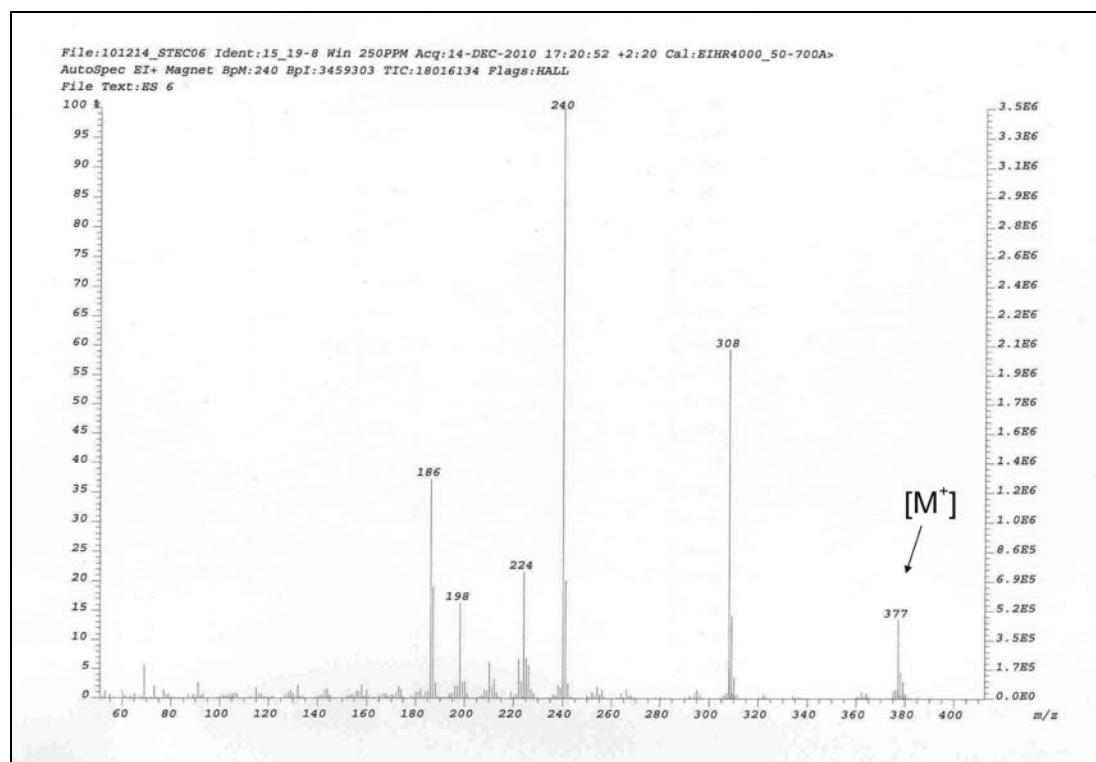


Abbildung 6-26: EI-MS von 2,6-Dimethyl-3-Farnesyl-4-Hydroxychinolin.

6.5.6 2,4-Dihydroxy-3-Farnesylchinolin

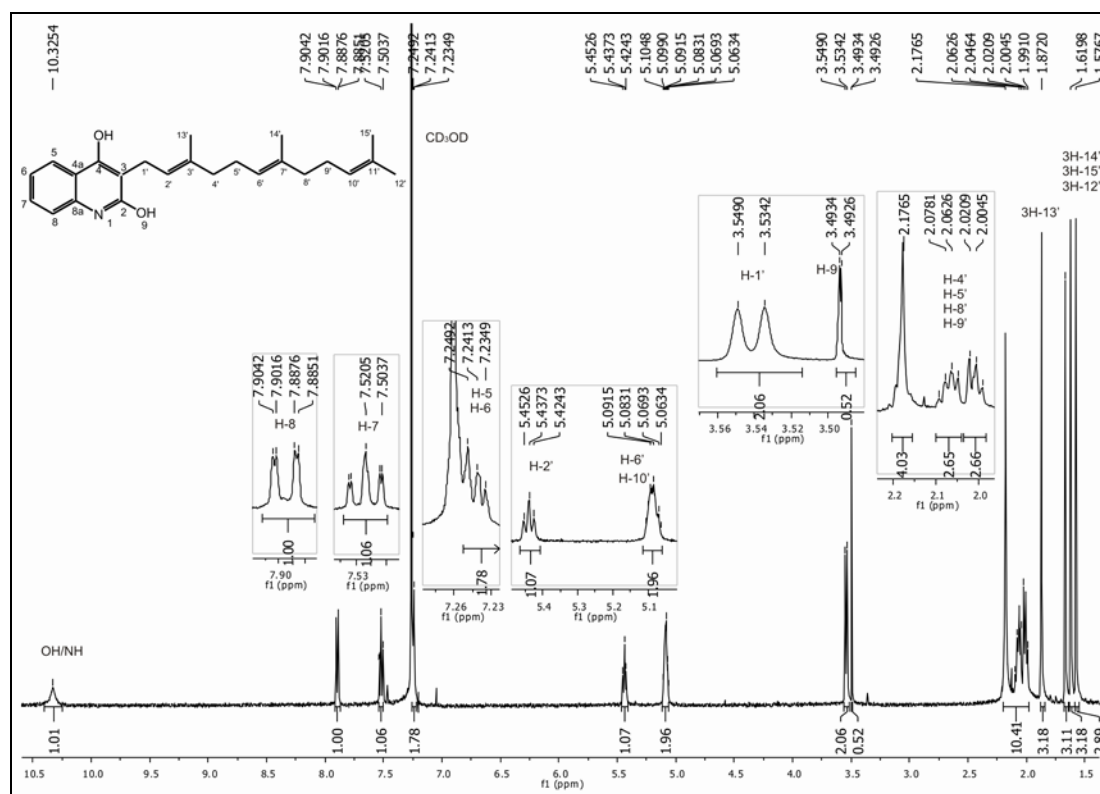
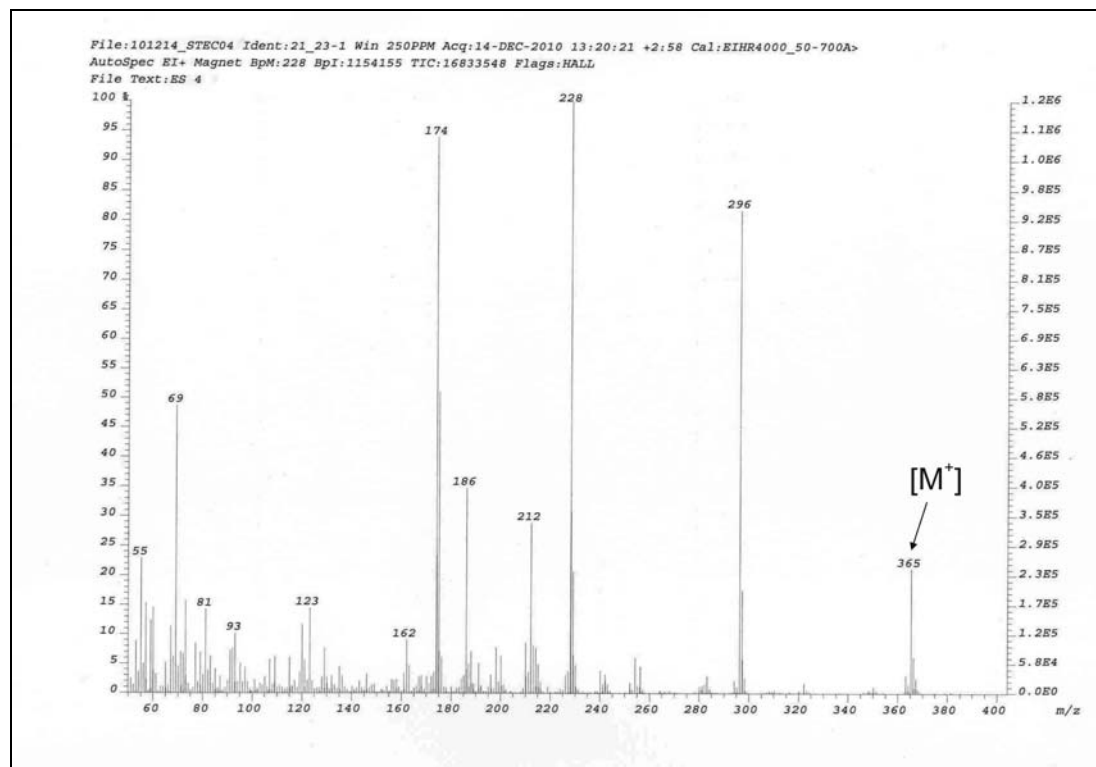
Abbildung 6-27: ^1H -NMR Spektrum von 2,4-Dihydroxy-3-Farnesylchinolin in CDCl_3 (500 MHz).

Abbildung 6-28: EI-MS von 2,4-Dihydroxy-3-Farnesylchinolin.

6.6 Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA_R53A

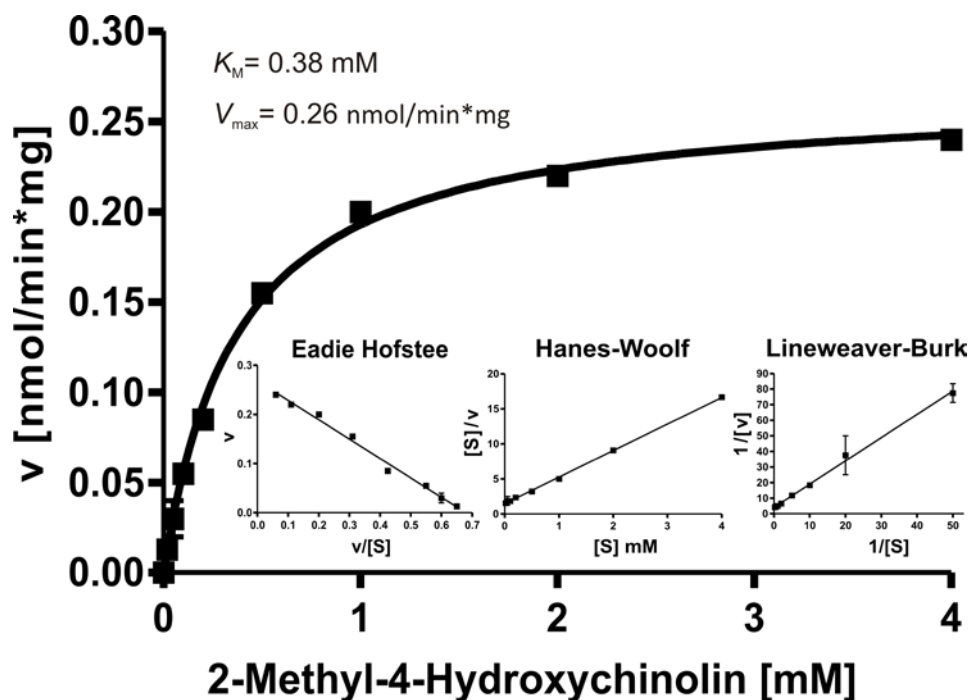


Abbildung 6-29: Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA_R53A gegenüber 2-Methyl-4-Hydroxyquinolin in Anwesenheit von 0.5 mM FPP.

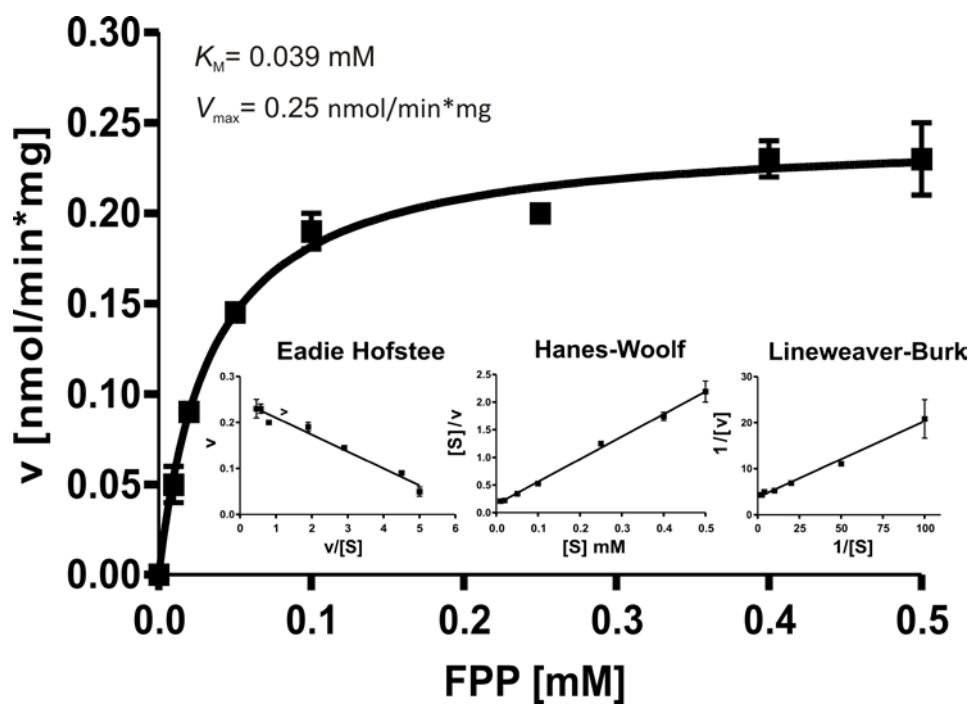


Abbildung 6-30: Bestimmung der kinetischen Parameter von AuaA_R53A gegenüber FPP in Anwesenheit von 2 mM 2-Methyl-4-Hydroxyquinolin.

6.7 MS-Daten der enzymatischen Produkte nach Tandeminkubation mit FgaPT2 und 7-DMATS

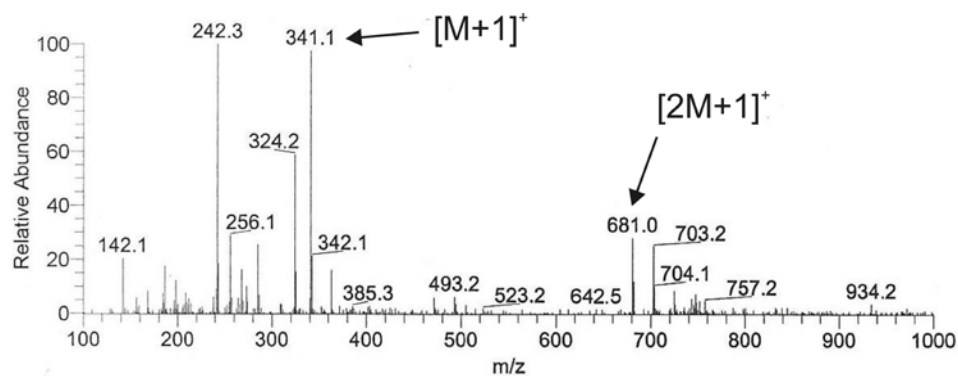


Abbildung 6-31: +ESI von Di-(Dimethylallyl)-L-Tryptophan hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

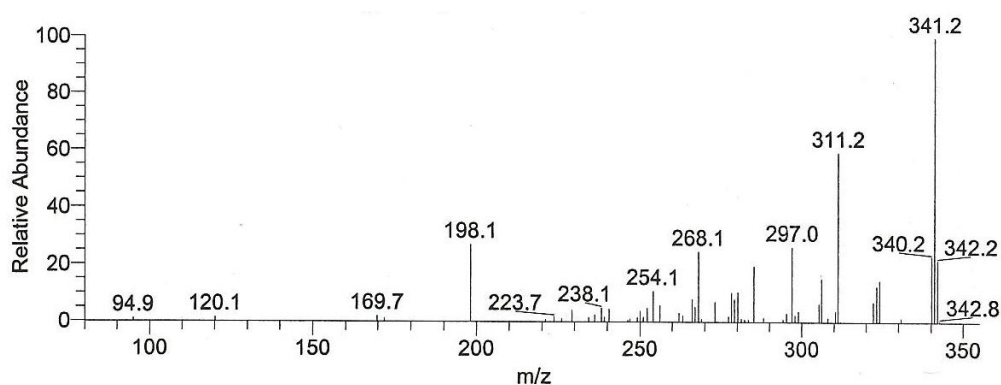


Abbildung 6-32: ms^2 von $[M+1]^+$ m/z 341.1 des Di-(Dimethylallyl)-L-Tryptophan hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

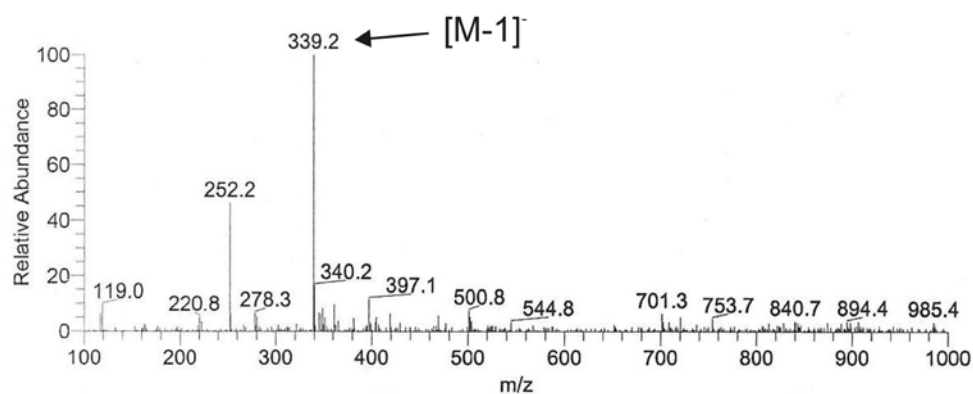


Abbildung 6-33: -ESI von Di-(Dimethylallyl)-L-Tryptophan hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

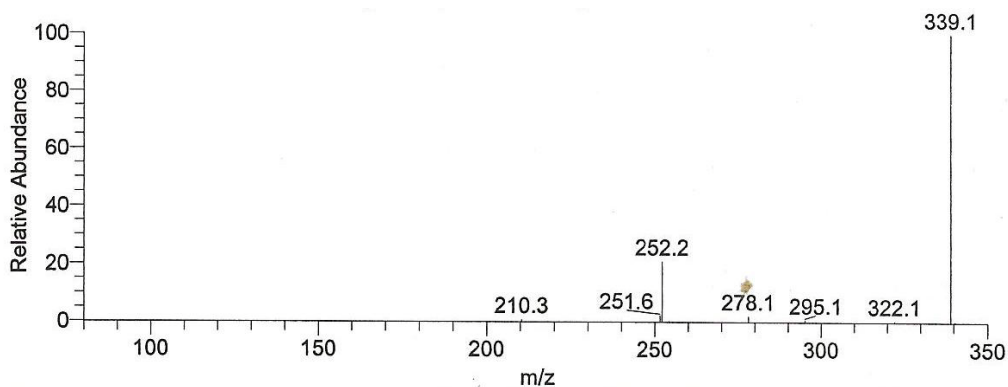


Abbildung 6-34: ms^2 von $[M-1]^+$ m/z 339.2 des Di-(Dimethylallyl)-L-Tryptophan hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

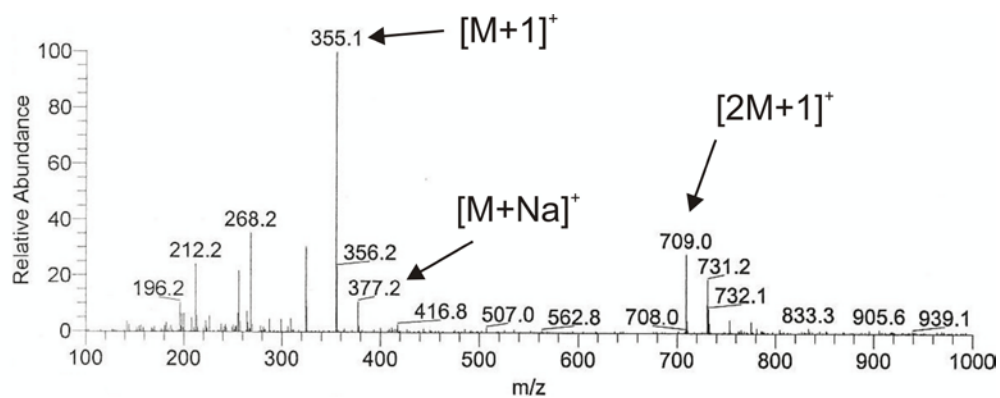


Abbildung 6-35: +ESI von Di-(Dimethylallyl)-L-Abrin hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

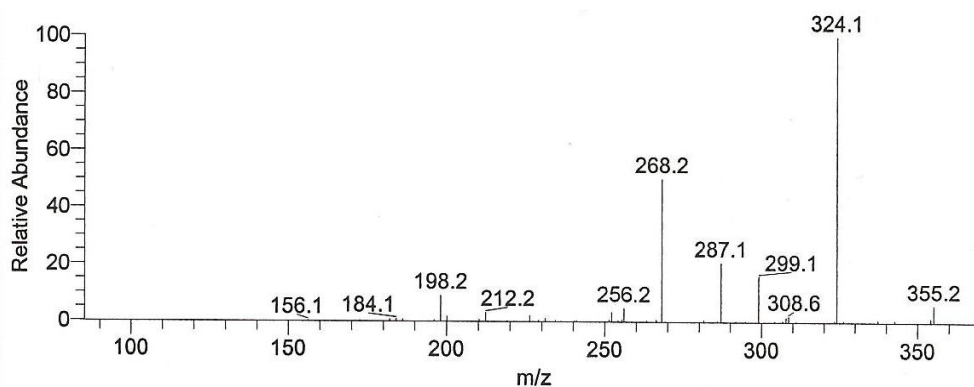


Abbildung 6-36: ms^2 von $[M+1]^+$ m/z 355.1 des Di-(Dimethylallyl)-L-Abrin hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

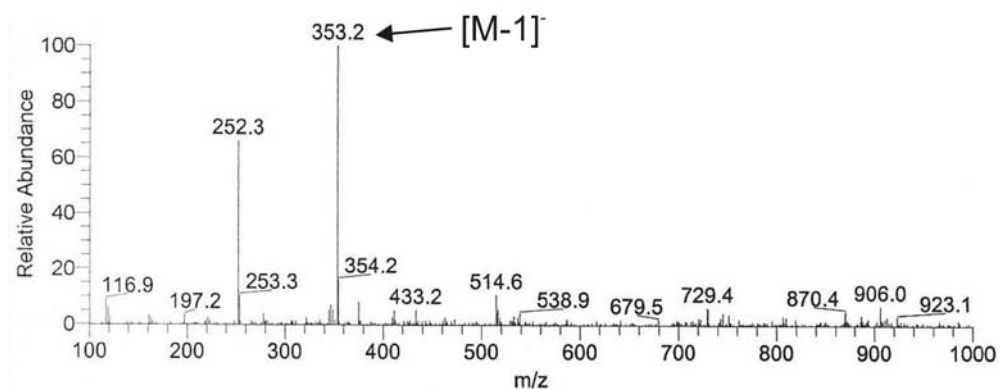


Abbildung 6-37: -ESI von Di-(Dimethylallyl)-L-Abrin hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

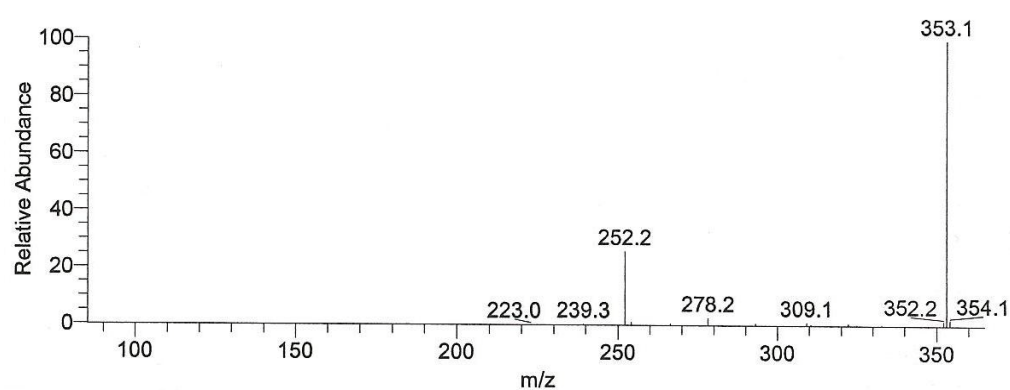


Abbildung 6-38: ms^2 von $[M-1]^-$ m/z 353.2 des Di-(Dimethylallyl)-L-Abrin hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

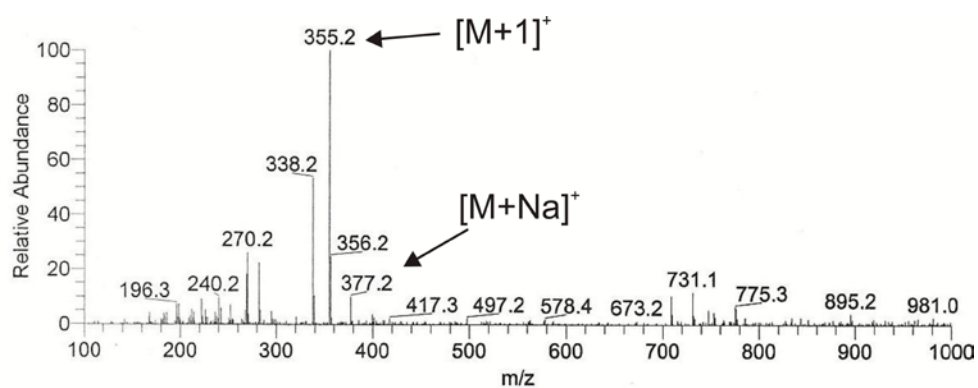


Abbildung 6-39: +ESI von Di-(Dimethylallyl)-L- β -Homotryptophan hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

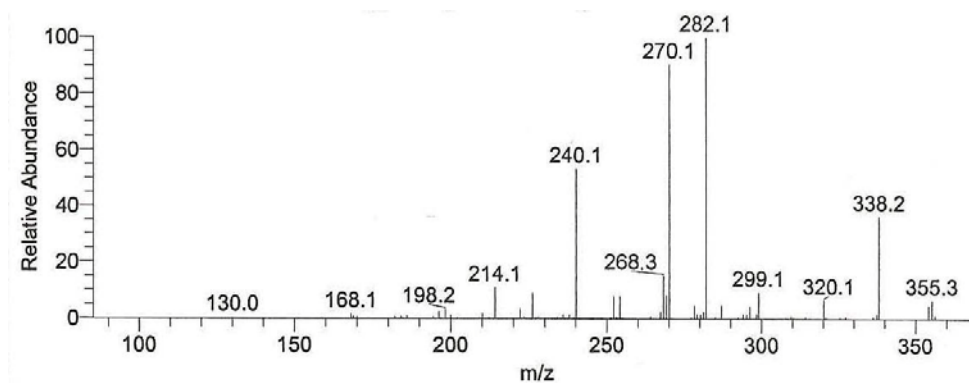


Abbildung 6-40: ms^2 von $[M+1]^+$ m/z 355.2 des Di-(Dimethylallyl)-L- β -Homotryptophan hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

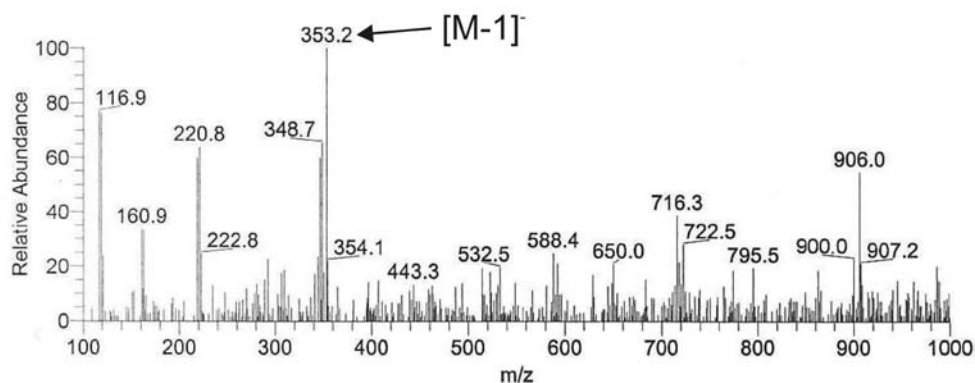


Abbildung 6-41: -ESI von Di-(Dimethylallyl)-L- β -Homotryptophan hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

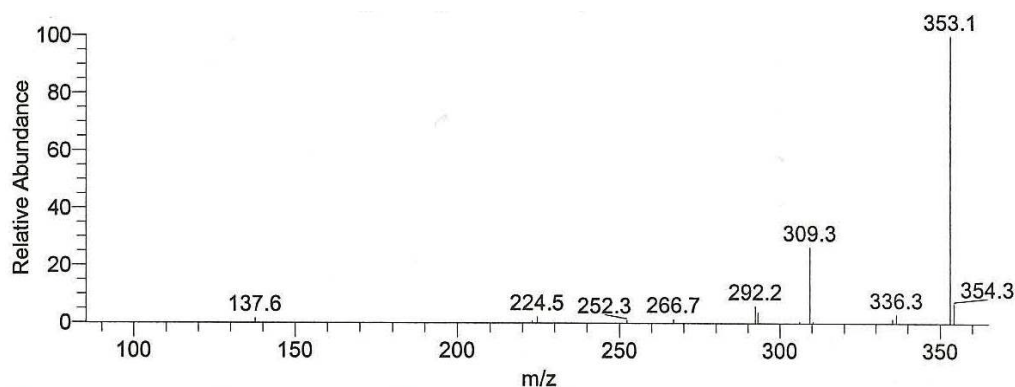


Abbildung 6-42: ms^2 von $[M-1]^-$ m/z 353.2 des Di-(Dimethylallyl)-L- β -Homotryptophan hergestellt mit FgaPT2 und 7-DMATS.

6.8 Spektren der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R

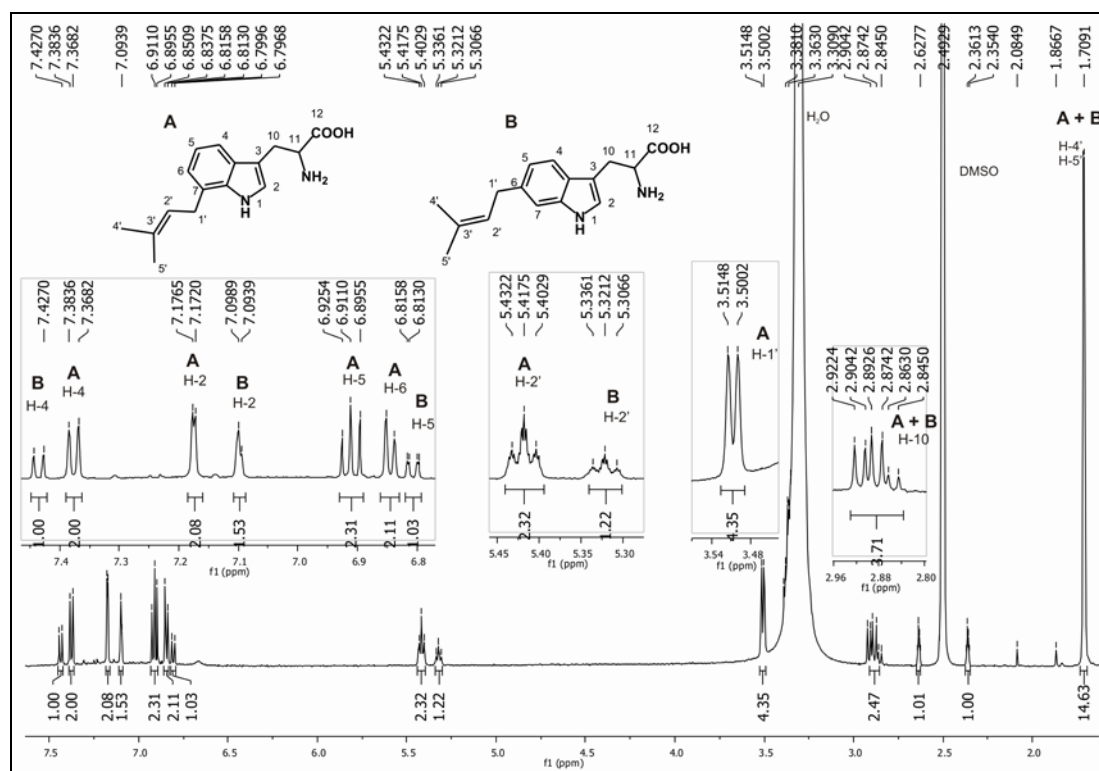


Abbildung 6-43: ¹H-NMR Spektrum der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_R298R in DMSO-*d*₆ (500 MHz).

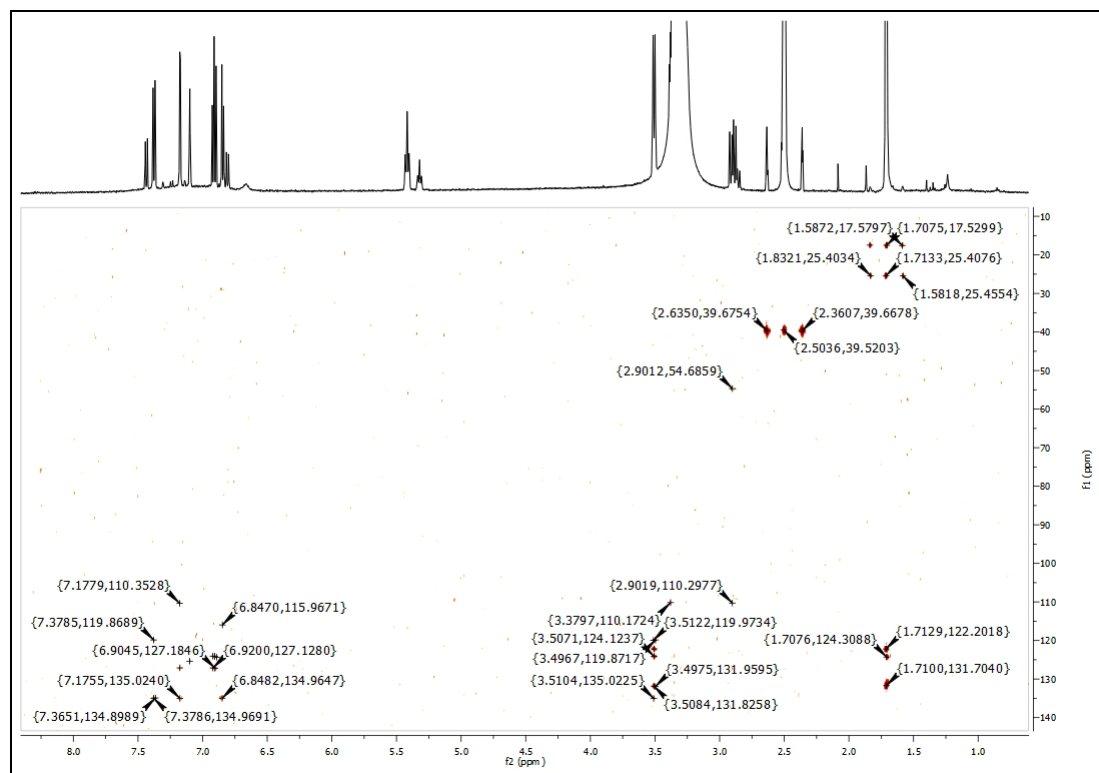


Abbildung 6-44: HMBC-Spektrum der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R in DMSO-*d*₆ (500 MHz).

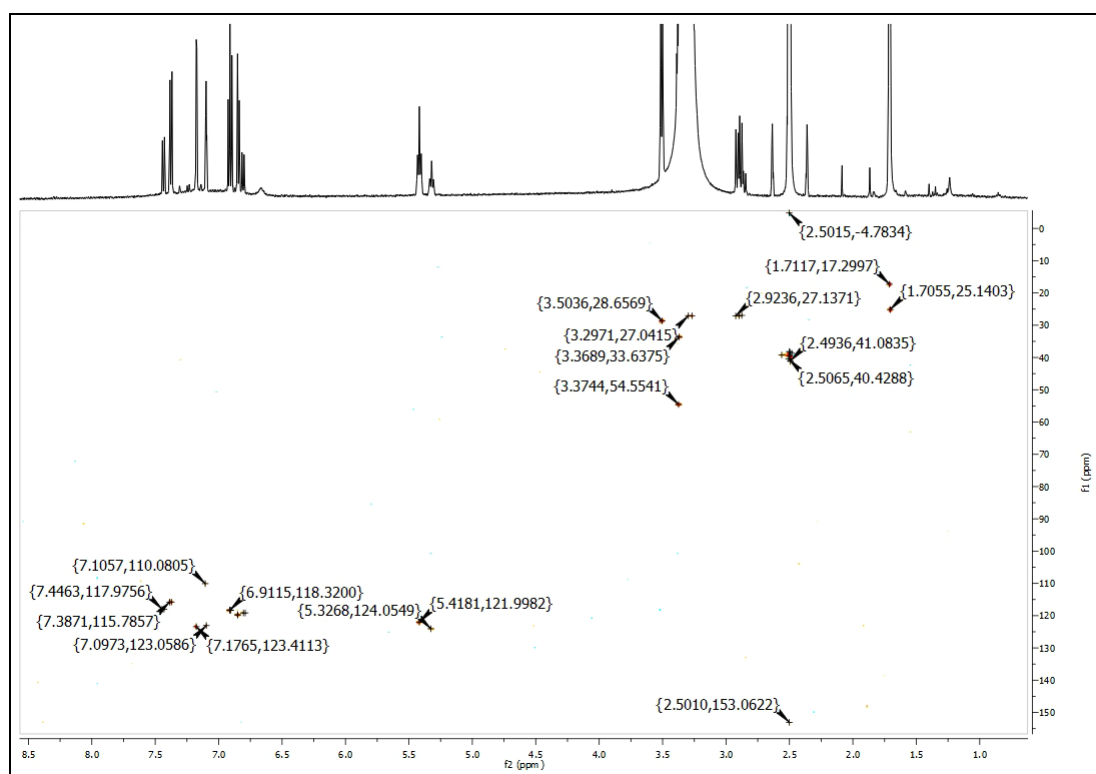


Abbildung 6-45: HSQC-Spektrum der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R in DMSO- d_6 (500 MHz).

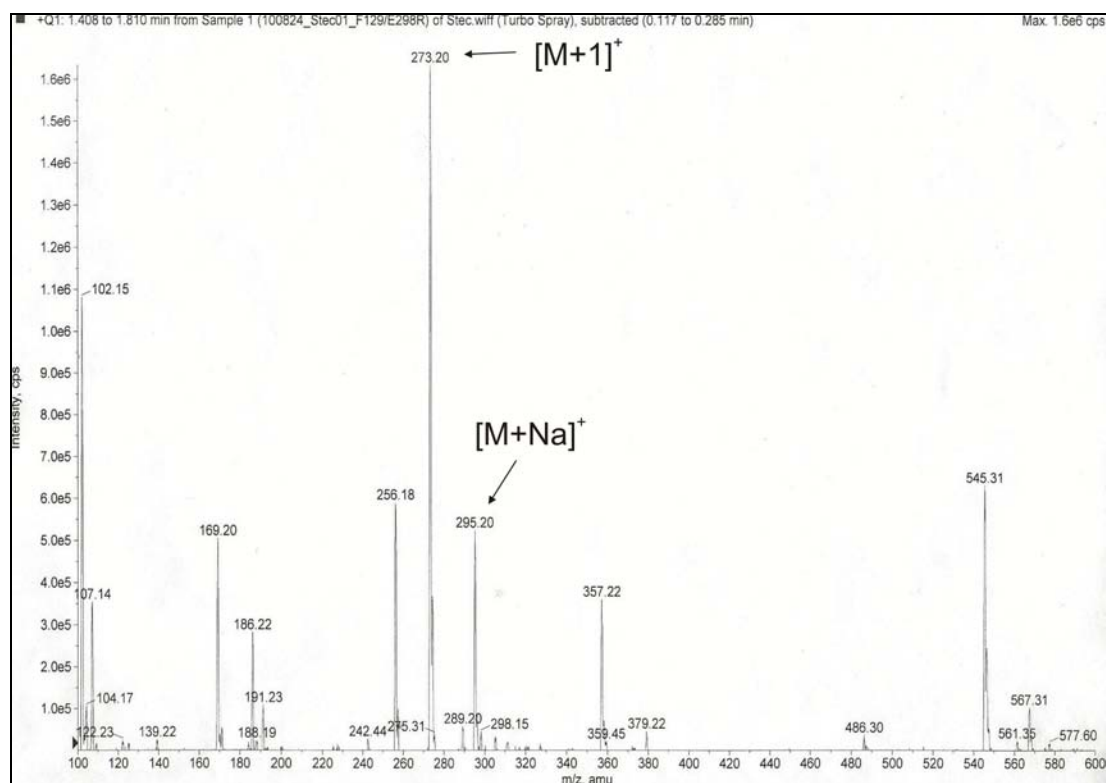


Abbildung 6-46: +ESI-MS der enzymatischen Produkte von 7-DMATS_F129I_E298R.

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die ausgezeichnete Betreuung und Förderung meiner Arbeit danken. Sowohl die Doktorarbeit, als auch meine persönliche Entwicklung haben stark von seinem Einfluss profitiert, wofür ich mich ganz herzlich bedanken möchte.

Ich danke Frau Prof. Dr. Petersen sehr für die Erstellung des Zweitgutachtens und für ihre freundliche Aufnahme am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie in Marburg.

Prof. Dr. Rolf Müller danke ich für die Möglichkeit zur Kooperation im Rahmen der Charakterisierung der Farnesyltransferase AuaA.

Bei Frau Dr. Xiu-Lan Xie möchte ich mich für die NMR-Analyse der enzymatischen Produkte des Mutanten 7-DMATS_F129I_E298R bedanken.

Für die Messung der NMR- und MS-Proben möchte ich mich bei Herrn Behm, Herrn Dr. Kämpchen, Herrn Newel, Frau Dr. Laufenberg, Frau Zitzer und Frau Lang-Henkel bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen Nici, Alex, Anika, Ole und Wen-Bing für die herzliche Aufnahme im Arbeitskreis in Düsseldorf bedanken. Besonders Ole möchte ich zum einen für den hilfreichen Gedankenaustausch bei molekularbiologischen Fragestellungen danken, aber auch für die harmonische und lustige Zeit im gemeinsamen Büro sowie während des Aufenthaltes in China.

Ich danke all meinen Kollegen des Arbeitskreises Prof. Li und Prof. Petersen für die schöne Laborzeit und die lustigen Mittagspausen. Auch an unsere gemeinsamen Aktivitäten außerhalb des Instituts erinnere ich mich gern zurück.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Chrissi und Xia für die umfangreiche Hilfestellung zu Fragen in der NMR-Spektroskopie sowie an Marco, der immer etwas Zeit zur Diskussion biochemischer Fragen fand.

Meinen Freundinnen Nadine und Melanie danke ich sehr herzlich sowohl für die kritische Durchsicht der Arbeit als auch für die Freundschaft, die auch über die Zeit in Münster hinaus bestehen blieb.

Ein großes Dankeschön gilt Timo für die gemeinsamen Umzüge nach Düsseldorf und Marburg, sowie für seine stetige Unterstützung und die aufmunternden Worte in der doch manchmal schwierigen Zeit.

Zuletzt und ganz besonders möchte ich mich bei meiner Mutter für ihre Liebe, Unterstützung und Vertrauen über all die Jahre bedanken.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Edyta Stec
Geburtsdatum	26.10.1977
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Anschrift	Stadener Str. 15 61197 Florstadt

Schul- und Berufsbildung

September 1984 – Juni 1989	Grundschule in Krakau
Juli 1989 – Juni 1990	Hauptschule in der Landwehr in Dortmund
Juli 1990 – Juni 1998	Gymnasium in Dortmund
Juni 1998	Abitur
August 1998 - Januar 2001	Ausbildung zur Bankkauffrau bei der Sparkasse Dortmund
Januar 2001 – September 2001	Tätigkeit als Bankkauffrau bei der Sparkasse Dortmund
Oktober 2001 – März 2006	Biologiestudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
April 2006 – März 2007	Diplomarbeit im Fachbereich Biologie am Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie in Münster
August 2007 – Oktober 2008	Beginn der Promotion an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf im Fachbereich Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
seit November 2008	Weiterführung der Promotion an der Philipps-Universität in Marburg am Institut für Pharmazeutische Biologie und

Biotechnologie

Oktober 2007-Juli 2011

Betreuung von pharmazeutischen Praktika
für Studenten im Grund- und Hauptstudium

April 2009

Forschungsaufenthalt an der Huazhong
University of Science and Technology in
Wuhan (China), Institut: Tongji Medical
School